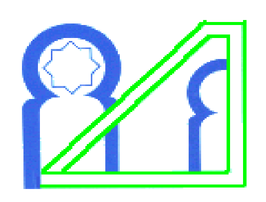


UNIVERSITÉ MOHAMMED V – AGDAL
FACULTÉ DES SCIENCES
Rabat



N° d'ordre: 2465

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

Melle Laila SBABOU

Discipline : Biologie
Spécialité : Génomique et biotechnologie

Diversité génétique du lupin au Maroc Et Etude du développement racinaire du lupin blanc sous stress abiotique par des approches de génomique fonctionnelle

Soutenue le 31 octobre 2009
Devant le jury:

Président:

Pr. Wail BENJELLOUN : *Doyen de la Faculté des Sciences, Rabat*

Examinateurs:

Pr. Fatiha BRHADA, *P.E.S, Faculté des Sciences, Rabat*
Pr. Abdelkarim Filali Maltouf, *P.E.S., Faculté des Sciences, Rabat*
Dr. Gilles BENA, *Chargé de recherche, IRD, France*
Pr. Said AMZAZI, *P.E.S., Faculté des Sciences, Rabat*
Pr. Cherkaoui EL MODAFAR, *P.E.S., FST, Marrakech*
Dr. Patrick DOUMAS, *Chargé de recherche I.R.D., France*

AVANT- PROPOS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM) de la Faculté des Sciences de Rabat (FSR), Université Mohammed V- Rabat Agdal sous la direction du Pr. Fatiha BRHADA.

Ce travail est réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire de la faculté des siences de Rabat et l'unité d'Agronomy and Plant Genetics de l'université du Minnesota Twin cities de Saint Paul (USA).

En tant que lauréate Fulbright je tiens à exprimer mes vifs remerciements à la Commission Maroco-Américaine (MACECE) et AMIDEAST avec le Fulbright Scholarship Program, pour le support financier, le suivi et soutien le long de mon séjour aux USA.

L'encadrement scientifique ce cette thèse a été agréablement assuré par ma très chère directrice de thèse le professeur Fatiha BRHADA. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour son suivi, sa disponibilité, sa compréhension, son respect des engagements et pour ses encouragements continus. Je la remercie aussi pour sa patience et sérieux lors de la correction de mon manuscrit.

Les mots ne sauront traduire ma gratitude et remerciements pour mon professeur (the Boss) Pr. Abdelkarim FILALI-MALTOUF, responsable du LMBM, et Vice Président aux Affaires Académiques, Estudiantines et Modernisation de la Présidence Université Mohammed V-Agdal. Je le remercie d'avoir su diriger et orienter mes travaux de recherches tout en me laissant une large marge de liberté pour mener à bien ce travail. Sa passion pour la recherche, son esprit innovateur et son dynamisme perpétuel sont exemplaires. Etre son étudiante fut un grand honneur.

Milles merci au Dr. Carroll VANCE, directeur de recherche de l'unité d'Agronomy and Plant Genetics de m'avoir gentiment accueilli parmi son équipe. Je le remercie d'avoir cru au projet SCRECROW et d'avoir mis à ma disposition tout les moyens pour le mener. Je le remercie lui et sa douce épouse Michelle pour leur sensibilité et amitié.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent au président du jury et Doyen de la Faculté des Sciences Pr. Wail BENJELLOUN de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury malgré tout ses engagements.

Je remercie Dr. Gilles BENA d'avoir gentiment accepter de lire ma thèse et aussi de faire partie du jury. Je le remercie particulièrement pour sa bonne humeur, son énergie et enthousiasme qu'il apporte à l'équipe LMBM/LMI. Je lui souhaite un bon courage dans sa mission.

J'exprime tous mes remerciements au Pr. Said AMZAZI, mon ancien professeur de biochimie et vice doyen de la faculté des Science de Rabat d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Mes profonds remerciements au professeur Cherkaoui El MODAFAR de la faculté des sciences et techniques de Marrakech pour avoir aimablement accepté de lire mon manuscrit et aussi de se déplacer volontierement pour juger ce travail.

Mes profonds remerciements vont aussi au Dr. Claudine FRANCHE, directeur de recherche à l'institut de recherche pour le développement IRD-France d'avoir bien voulu consacrer de son temps pour lire ma thèse et critiquer le travail.

De l'autre bout de la terre, je voudrais aussi remercier l'ensemble des personnes ayant très largement participé à la réalisation du projet SCARECROW: Susann MILLER, Bruna BUCCIARELLI, Kelly ZINN et Jun LIU. Je les remercie pour la passion et l'énergie qui nous ont animés et unis au fils des découvertes. Qu'ils sachent que j'ai beaucoup appris à leurs côtés.

Mes remerciements aux enseignants du LMBM, Mr. Jamal AURAG, Mr Elbekkay BERRAHO, Mme Jamila MAATALAH et Mme Ilham BOUHMOUCHE. Je remercie particulièrement Mme Bouchra BELKADI pour les encouragements et soutien perpétuels.

Un merci tout particulier s'adresse à mes deux collègues et amis Dr. Leila MEDRAOUI et Dr. Konate IBRAHIM pour toutes les anecdotes et émotions qu'on a partagé dans la salle BM. Je leur souhaite une bonne continuation dans leur vie familiale et professionnelle.

Je remercie encore une fois Leila MEDRAOUI pour son amitié et aussi d'être toujours présente au bon moment.

Je désire terminer en remerciant mes cinq sources de joie et de force: mon père Mohammed SBABOU, ma mère Jmia CHAHBOUNE, ma sœur Amira et mes deux frères Rida et Achraf. Merci de m'avoir soutenue et encouragé pendant les moments de doutes.

PREAMBULE

Le travail réalisé s'inscrit dans le cadre des projets suivants:

- PROTARS I – P5T2 / 13
- IRD (Aire Développement) Project No 01-2-MAR- 28-1
- USDA/NRI (projet N° 2005-35100-16007) et USDA/ARS

Publications

SBABOU L., BRUNA B., MILLER S., LIU J., BRHADA F, FILALI-MALTOUF A., ALLAN D., VANCE C. Molecular analysis of white lupin *SCARECROW* genes expressed in cluster roots. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, No. 5, pp. 1351–1363, 2010.

SBABOU L., BRHADA F., THAMI ALAMI I., FILALI-MALTOUF A. (2009). Genetic diversity of Moroccan Lupinus germplasm investigated using ISSR and AFLP markers. *International journal of agriculture and biology, Vol. 12, Issue 1 (January),2010.*

SBABOU L., BRHADA F., FILALI-MALTOUF A. (2009). A modified protocol for total DNA isolation suitable for RAPD, ISSR and AFLP analyses: *Lupinus* as a study case, *Acta botanica (sous press).*

Séminaires présentés

- **Characterization and Conservation of *SCARECROW* in white lupin:**
  - Master Qualité Microbiologique et Sécurité sanitaire. 2008 (FSR).
- **Expression et fonction des gènes: quelques techniques et applications:**
  - Master Biotechnologies et Amélioration Génétique des Productions Agricoles. 2009, 2010 (IAV- Hassan II).
  - Master Sciences et Technologies de la Vie et de la Santé. 2010 (FSR).
- **Marqueurs moléculaires et diversité génétique:**
  - Master: Biotechnologies et Amélioration Génétique des Productions Agricoles. 2009. (IAV- Hassan II).
- **Introduction à la bioinformatique:**
  - Master Sciences et Technologies de la Vie et de la Santé. 2010 (FSR).

Communications orales

- *Molecular* **analysis of SCARECROW genes expressed in white lupin cluster roots.**
  2010. Première Journée du **L**aboratoire **M**ixte **I**nternational Biotechnologies microbienne et végétale
- **Characterization and Conservation of *SCARECROW* in white lupin.**
  2008, Université al Akhawayn.
- **Etude de la diversité génétique du Lupin (*Lupinus* spp.) marocain par les marqueurs RAPD et AFLP**.
  2004 (10-11 Décembre). Première rencontre du pole de compétence MisoBioP, FST –Fès.

Communications affichées

- **Clonage et analyse moléculaire du gène SCARECROW au niveau du système racinaire du Lupin blanc.**
  2008, 4ème Congrès *International de* Génétique et Biologie Moléculaire & de biotechnologie. Ouarzazate.

- **Scarecrow (SCR) Mediates Root Development in *Lupinus albus* and *Medicago truncatula.***
  2007 (July 7-11). Plant Biology and Botany. Chicago, Illinois.

- **Preliminary study of genetic diversity in Moroccan *lupinus* species using the RAPD markers.**
  2004 (8-10 Septembre). 7° National Biotechnology Congress- University of Catania.

- **Etude préliminaire de la diversité génétique du Lupin Marocain par les marqueurs RAPD.**
  2004 (8 et 9 mars). Séminaire international - développement des cultures fourragères : une nécessité pour améliorer les productions animales et atténuer la dégradation des ressources naturelles. INRA- Rabat.

- **Etude préliminaire de la diversité génétique du Lupin Marocain par les marqueurs RAPD**
  2003. Troisième congrès de Génétique et de Biologie Moléculaire. Tanger.

Résumé

L'objectif de ce travail a été d'étudier la variabilité génétique des populations marocaines de *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii* et *L. luteus.* Les marqueurs ISSR et AFLP ont été très informatifs avec des indices de diversité génétique (PIC) proches de 1. Aussi, ces marqueurs ont permis de révéler un haut niveau de polymorphisme.

Des valeurs de similarité élevées ont été enregistrées entre les quatre espèces de lupin et aussi entre des accessions de la même espèce. Les valeurs de similarité les plus importantes ont concerné le lupin cultivé *L. albus* et *L. luteus*. Par ailleurs, les espèces et accessions de lupin étudiées ont été caractérisées par un certain nombre de marqueurs spécifiques. La classification hiérarchique des différentes accessions de lupin à la base de l'indice de diversité de Dice montre leur groupement indépendamment de leurs origines géographiques.

D'un autre côté, *n*ous avons isolé chez *Lupinus albus* deux gènes SCARECROW SCR, LaSCR1 et LaSCR2. L'hybridation *in situ* et l'étude du promoteur ont montré que les deux gènes s'expriment de manière consistante au niveau de l'endoderme des racines normale et racines proteoïdes du lupin blanc. L`expression du SCR au niveau des racines proteoïdes, révélée par PCR en temps réel, a été influencée par le stade de développement. Aussi, le silençage du SCR chez *Lupinus albus* et *Medicago truncatula via* l'ARN d'interférence a permis de réduire le développement racinaire au niveau des racines chevelues. Les deux gènes SCR du lupin sont orthologues au SCR d'*Arabidopsis thaliana.*

Mots clés: *Lupinus,* diversité*,* AFLP, ISSR, SCARECROW, Racines proteoïdes, ARNi**.**

Abstract

The objective of this work was the evaluation of the genetic variability of the Moroccan populations of *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii* and *L. luteus*. The ISSR and AFLP markers were very informative and generated a high level of polymorphism. We scored an important similarity values between and within the studies lupine species. We also detected some species specific markers. The hierarchical clustering of lupine accessions basing on the Dice similarity coefficient shows the grouping of accessions independently of there geographical origin.

Also, we isolated two *Lupinus albus* SCARECROW SCR genes LaSCR1 and LaSCR2.
In situ hybridization and gene promoter::reporter staining showed *LaSCR1/2* transcript accumulation in the endodermis of both normal and cluster roots. Expression of *LaSCR*s was not directly responsive to P-status of the plant but was a function of cluster root development. Suppression of *LaSCR1* in transformed roots of lupine and *Medicago* via RNAi delivered resulted in decreased root mass. Our results suggest we have characterized functional orthologs of *AtSCR*.

Key words: *Lupinus,* diversity, AFLP, ISSR, SCARECROW, cluster roots, RNAi.

ABRAVIATIONS

A, C, G, T	Adénine, cytosine, guanidine, thymidine
ABA	Acide abscissique
Acétosyringone	3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AIA	Acide Indol Acétique
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Ribonucléase
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARF	Auxin response factor
ATP	Adénosine tri-phophate
A.r	*Agrobacterium rhizogenese*
Aux	Auxin
BAC	Bacterial artificial chromosome
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Bovine serum albumi
bZIP	Basic leucine-zipper
CAPS	Cleaved amplified polymorphic sequence
CTAB	Cétyltriméthylammonium
COP1	Constitutive photomorphogenic 1
DMSO	DiMéthyl SulfOxide
DOF	DNA binding with one finger
DEPC	Diéthyl-pyrocarbonate
DIG	Digoxygénine
DO	Densité Optique
DNAse	Désoxyribonucléase
dNTP	Déoxynucléotides triphosphates
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EST	Expressed sequence tag
FT	Facteur de transcription
GAs	Gibbérellines
GAI	Gibberellin-intensive
RGA	Repressor of ga1-3
GRAS	GAI, RGA, SCARECROW
g, mg, µg	Gramme, milligramme, microgramme
GUS	Gène codant pour la β-glucuronidase (GUS
h, min, s	Heure, minute, seconde
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
ITS	Internal transcribed spacer
JAE	Jour après emergence
LaSCR	*Lupinus albus* SCARECROW

LB	Luria Bertani
M, mM, µM	Molaire, millimolaire, micromolaire
m, mm, cm	Mètre, millimètre, centimètre
MAR	méristème apical racinaire
Mb, Kb, pb	Millions de paire de base, kilo paire de base, paire de base
MOPS	Acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
nptII	Gène codant pour la néomycine phospho transférase (résistance à la kanamycine)
NAC	no apical meristem cup-shaped cotyledon
(n), (2n), (3n)	Haploïde, diploïde, triploïde
NLS	nuclear localisation signal
OGM	Organismes génétiquement modifiés
P	Phosphate
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction.
pH	Potentiel hydrogène
QTL	Quantitative traits loci
Qsp	Quantité suffisante pour
RAPD	Random amplified polymorhism DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
SDS	Dodium Dodécyl Sulfate
SSR	Simple Sequence Repeat
SNP	Single nucleotide polymorphism
SCR	SCARECROW
SHR	SHORT ROOT
SSC	Salt Sodium Citrate
TAE	Tris Acétate EDTA
TE	Tampon Tris EDTA
UV	Ultraviolet
UNIP	*Union* Nationale Interprofessionnelle des *Plantes*
USDA	United States Department of Agriculture
V	Volt
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
YPR	Young proteoid roots

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

SOMMAIRE

CHAPITRE II: Le lupin au Maroc: Structuration de la diversité

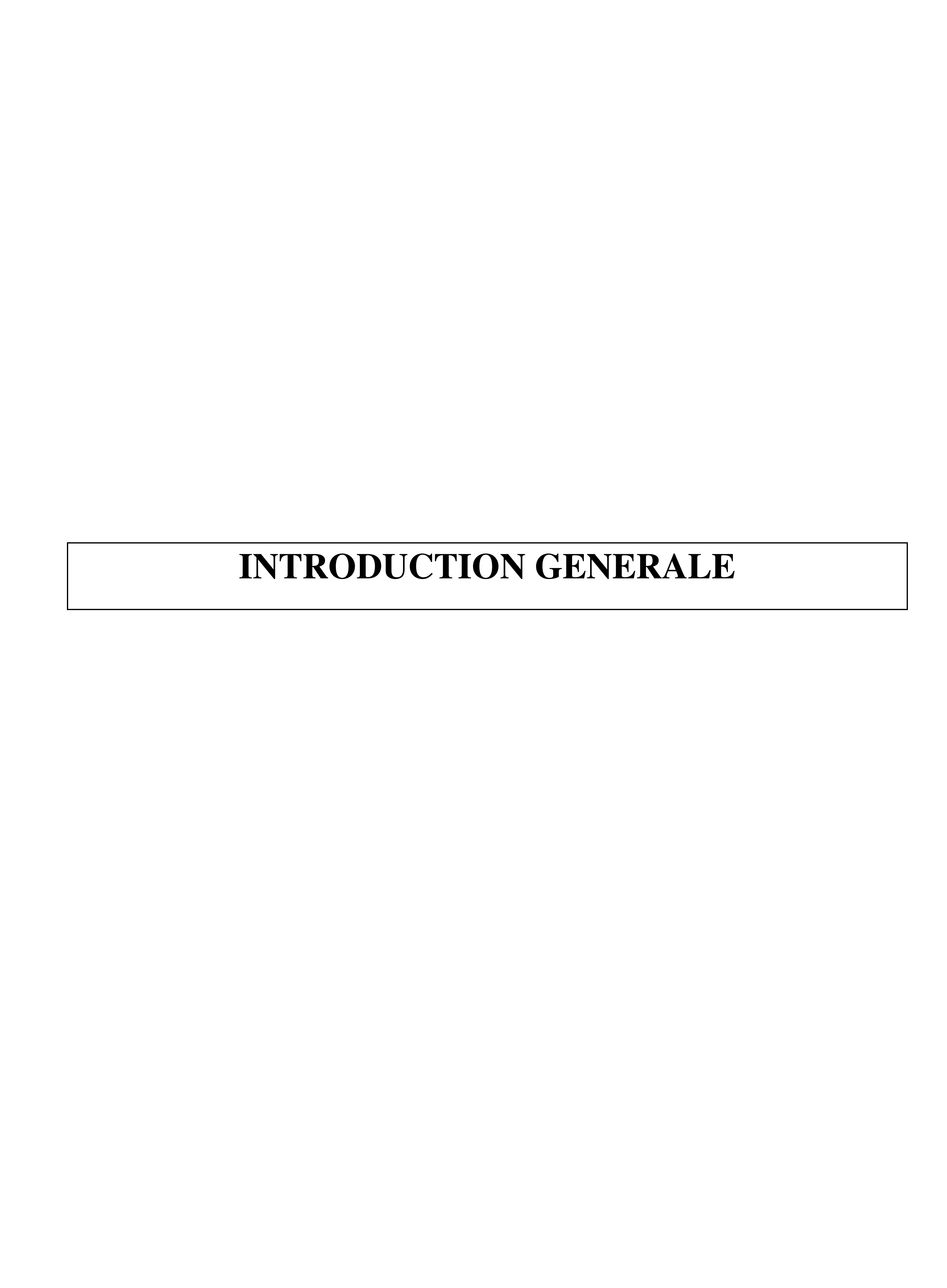
CHAPITRE III: Stress abiotique et facteurs de transcription chez le lupin blanc

Partie 1: *Clonage du gène SCARECROW*

Partie 2: Expression du gène Scarecrow au niveau du système racinaire du lupin blanc

Partie 3: Expression tissulaire de LaSCR1 et LaSCR2 au niveau des racines de *Lupinus albus* et de *Medicago truncatula*

Partie 4: Analyse de la fonction du gène SCR



INTRODUCTION GENERALE

L`analyse de la variabilité génétique des êtres vivants en particulier ceux d'importance agronomique constitue une étape essentielle pour comprendre les mécanismes d`évolution des espèces ainsi que pour assurer une bonne gestion des ressources biologiques pour une utilisation durable.

Le lupin est une légumineuse à grande importance agronomique, économique et nutritionnelle. Le lupin est cultivé depuis plus de 4000 ans pour ses graines très riches en protéines et en huiles ce qui lui confère une bonne valeur énergétique.

Néanmoins, le lupin n'a pas été largement utilisé pour l'alimentation humaine en raison de la présence d'alcaloïdes qui donnent aux lupins sauvages un goût très amère. Aujourd'hui, la culture du lupin dans le monde entier est limitée aux variétés douces.

Les productions mondiale du lupin augmentent chaque année malgré le fait que les grandes productions restent restreintes à dix pays (Anonyme, 2001) (Figure 1). L'Australie couvre la majorité des productions mondiale à savoir 82 %, correspondant à 1210000 tonnes par an. L`Europe assure 11,8% des productions avec 174300 tonnes dont 110000 tonnes (63% de la production européenne) est couverte par l`Allemagne. Par ailleurs, les productions africaines se limitent à 2,41%, correspondant à 35400 tonnes par an. Ces productions sont principalement assurées par le Maroc, l`Afrique du sud et l`Egypte (Anonyme, 2001).

Au Maroc, le développement du lupin à l'état spontané et son importance agronomique et socio-économique; en particulier en tant qu'une ressource en protéine alternative à la fève et au pois; a suscité un grand intérêt de la part des chercheurs. En effet, le lupin, a fait partie d'un programme de préservation des ressources génétiques marocaines établis en collaboration entre le Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences de Rabat et l'unité de recherche; Amélioration, Conservation et Valorisation des Ressources Génétiques; de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Rabat dans le cadre du projet PROTARS I – P5T2/ 13. L'un des objectifs de ce programme étant la gestion des ressources génétiques du lupin au Maroc visant à leur conservation et utilisation durable. La caractérisation de la diversité génétique du lupin par le biais des outils moléculaires contribuera d'une part à l'étude fondamentale de la variabilité génétique et de la structure de la diversité de cette ressource phytogénétique; et d'autre part à l'élaboration d'une méthodologie de conservation *in situ* et *ex situ*.

Dans le cadre de ce travail, les marqueurs ISSR (Inter- Simple Sequence Repeat) et AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism) ont été utilisés pour l'évaluation de la diversité génétique inter- et intra- spécifique de quatre espèces de lupin marocains *L. albus*, *L. cosentinii*, *L. luteus* et *L. angustifolius*.

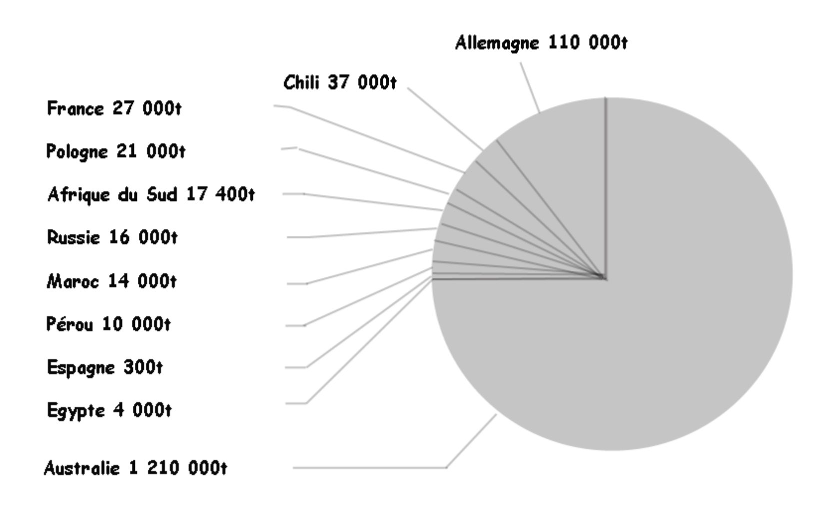


Figure 1*:* Les Productions mondiales du Lupin en tonnes.

(Source UNIP 2001)

D'un autre côté, nous nous sommes intéressés au le lupin blanc (*L. albus*) en tant que plante modèle pour étudier l'adaptation des plantes aux carences phosphoriques (Neumann & Martinoia 2002; Vance *et al.* 2003; Lambers *et al*. 2006). En réponse à une carence en phosphore, le lupin blanc développe des racines spéciales appelées racines protéoides. Ces racines présentées sous forme de radicelles denses, sont caractérisées par une croissance déterminée (Dinkelaker *et al.* 1995; Johnson *et al.* 1996; Watt *et al.* 1999). Les racines proteoïdes développent un mécanisme d'adaptation spécial pour l'acquisition du phosphore du sol.

Ainsi, les racines proteoïdes sécrètent des citrates et malates (Dinkelaker *et al.* 1995; Shane & Lambers 2005), des phosphatases acides (Miller *et al.* 2001; Gilbert *et al.* 2000) et des protons (Marschner *et al.* 1986; Neumann & Romheld 1999; Neumann *et al.* 2000). Ces exsudats permettent d'augmenter la disponibilité du phosphore dans la rhizosphère. Aussi, un certain nombre de gènes sont exprimés au niveau des racines proteoïdes et sont impliqués dans l'acquisition du phosphore (Uhde-Stone et al, 2003).

Cette partie du travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche visant l'étude des gènes impliqués dans le développement racinaire du lupin en réponse à une carence phosphorique. Ce projet a été financé par: une bourse Fulbright attribuée par la commission Maroco-Américaine

pour les Echanges Educatifs et Culturels; un projet USDA/NRI (projet N° 2005-35100-16007) et USDA/ARS.

Par le biais de filtres à ADN (macroarrays) nous avons analysé l'expression de 161 étiquettes ESTs (expressed sequence tags); isolées de racines proteoïdes; en réponse à une carence d'azote (-N), de fer (-Fe) ou de phosphore (-P).

Parmi les ESTs analysées, un clone a été intéressant de part sa grande similarité avec le gène *SCARECROW* (SCR) et de ce fait a été choisi pour une étude plus approfondie.

Le gène SCR code pour un facteur de transcription appartenant à la famille GRAS (Pysh *et al.* 1999) et connu pour son rôle important dans la structuration radiale des cellules et dans le maintien des cellules souches (Scheres *et al.* 1995; DiLaurenzio *et al.* 1996; Wysocka-Diller *et al.* 2000; Kamiya *et al.* 2003; Sabatini *et al.* 2003; Heidstra *et al.* 2004).

Cette thèse est présentée en trois chapitres.

Le chapitre I, dresse une analyse bibliographique assez détaillée sur le lupin et une introduction au travail réalisé.

Le chapitre II, résume les résultats du travail mené sur la diversité du lupin du Maroc. Ce travail a été entièrement réalisé au laboratoire de microbiologie et de biologie moléculaire de la faculté des sciences Rabat.

Le chapitre III, présente le lupin blanc en tant que plante modèle pour l'étude du stress phosphorique. Ce chapitre focalise sur les résultats de l'analyse moléculaire des deux gènes *SCR* chez le lupin blanc LaSCR1 et LaSCR2. Cette partie du travail a été réalisée au département d' « Agronomy and plant Genetics » à l'université du Minnesota, Saint Paul aux Etats Unis d'Amérique.

Chapitre I:

Revue bibliographique

INTRODUCTION

Cette première partie de la thèse est une introduction au travail dans laquelle différentes parties seront discutées. Nous nous proposons de donner une présentation générale du lupin depuis sa classification jusqu`à sa phylogénie avec une vue particulière sur les lupins du Maroc. Ensuite, un aperçu sur l`étude de la diversité génétique via les marqueurs moléculaires et l`analyse de cette diversité moyennant les méthodes de classification et les analyses factorielles. Ce volet synthétise aussi l`importance de la génomique structurale et de la génomique fonctionnelle comme deux disciplines complémentaires et leurs importances dans la compréhension de l`information génétique. Dans cette partie, on présente aussi le lupin blanc en tant que plante modèle pour l`étude de l`adaptation au stress phosphorique et aussi les mécanismes d`adaptations adoptés par cette plante.

I- Le genre *Lupinus*

I-1- Classification

Les lupins appartiennent à l`embranchement des spermaphytes, le sous-embranchement des angiospermes, la classe des *Magnoliopsidae* (Dicotylédones), la sous-classe des *Rosidae*, l`ordre des fabales, la famille des *Fabaceae* (Légumineuses), la sous-famille des papilionacées, tribu des genistées et le genre *Lupinus*.

Ce genre comporte 200 à 500 espèces (Dunn et Gillet, 1966) adaptées à différentes conditions écologiques et présentes sur des sols neutres à acides. Les lupins ont largement été utilisés comme plantes ornementales et dans l`alimentation humaine et celle du bétail.

On reconnaît deux groupes majeures qui sont géographiquement séparés et isolés, les espèces du nouveau monde et les espèces de l`ancien monde. Plusieurs centaines d`espèces sont reconnues dans le nouveau monde où elles s`étendent de l`Alaska jusqu`à l`Argentine (Dunn, 1984). Seules 12 espèces sont connues dans le groupe de l`ancien monde. Ces espèces sont séparées en deux types: espèces aux graines lisses et d`autres aux graines rugueuses.

Une grande part de la diversité a été largement discutée par Plitmann (1981), Dunn (1984), Planchuelo & Dunn (1984) et Monteiro & Gibbs (1986). Les espèces du nouveau monde présentent généralement de petites graines (<60 mg) et sont caractérisées par une allogamie.

Les espèces de l`ancien monde ont par contre de large graines (>60 mg) et se caractérisent par leur autopollinisation (Plitmann, 1981). Cowlings *et al* (1998) rapporte que c'est grâce aux caractéristiques citées que les lupins de l`ancien monde sont exploités dans l`agriculture. L`espèce *L. mutabulis* constitue une exception chez les lupins du nouveau monde avec de large graines et c'est pour ceci qu'elle a été sélectionnée par les fermiers au sud de l`Amérique.
Les travaux de Gladstones (1974) constituent une référence dans la taxonomie des lupins de la méditerranée et d`Afrique et permettent de clarifier les confusions et controverses rencontrées dans la taxonomie des *Lupinus* qui datent de l`époque linnéenne.
Dans la littérature plusieurs espèces de lupin ont été faussement appelées par leurs synonymes botaniques. Par exemple *L. termis* est attribuée par quelques auteurs à *L. albus* var. *albus* originaire d`Egypte.

I-2- Description botanique

Les lupins de l`ancien monde sont des espèces herbacées annuelles présentant des feuilles digitées. Elles sont principalement autogames et caractérisées par leur aneuploïdie avec une variation du nombre de chromosomes de 32 à 52. Selon la structure du tégument des graines on peut définir deux groupes: les lupins a semé lisse connus en méditerranée et les lupins a semé rugueuse présents particulièrement en Afrique du nord (Tableau I.1 et I.2) (Gladstone, 1994; Heyn et Herrnstadt, 1977; Plitmann et Pazy, 1984).
Chez les espèces du nouveau monde, on reconnaît des centaines d`espèces annuelles ou vivaces qui peuvent être herbacées ou vasculaires présentant des feuilles digitées. Ces plantes sont autogames ou allogames avec un nombre de chromosomes de 48 généralement fixe. Cependant, quelques taxons font exception avec 2n=96 ou 36 (Smith, 1944; Phillips, 1957, Turner, 1957). Ce groupe est présent dans les Highlands subtropicales des régions centrales du sud d`Amérique avec quelques représentant dans le sud-est des Etats Unis (Dunn, 1984; Planchuelo et Dunn, 1984; Monteiro et Gibbs, 1986).

Tableau I.1: Groupe d`espèces de lupin à graines lisses avec leurs synonymes botanique, noms vernaculaires et nombre de chromosomes

Espèce	**Synonyme botanique**	**Nom vernaculaire**	**Nombre de chromosomes**
Graine lisse *L. albus* L.	*L. termis* Forsk *L. sativus* Gater *L. varius* gaertn. *L. prolifer* desr. *L. hirsitus* Eichw.	Francais: lupin blanc Anglais : white lupin, Mediterranean white lupin Italian: lupino	50
Var. *albus* Gladstone.	*L. albus* L. *L. albus* subsp. *albus* *L. albus* L. var. termis (Forsk) Alef. *L. albus* L. subsp. Termis (Forsk) Caruel	Anglais: Wild *albus* lupin	
Var. *graecus* (Boiss. et Sprun.) Gladstone.	*L. albus* L. subsp. Graecus (Boiss. et Spruner) Franco et P. Silva. *L. graecus* Boiss. Et Sprun. L. jugoslavicus (Kazimierski et Nowacki) *L. vavilovi* (Atabek. Et Maissurjan) *L. varius* L.		
L. angustifolius L.	*L. sylvestris* Lam *L. linifolius* Roth. *L. reticulatus* Desv. *L. leucospermus* boiss. *L. philistaeus* Boiss. *L. cryptanthus* Shuttlew. Ex. Campb *L. opsianthus* Atabek. *L. odoratus*	Anglais: blue-lupine, narrow-leafed lupin	40
L. luteus L.	*L. luteus* var. bicolor Merino *L. hispanicus* var. bicolor Merino *L. bicolor* (Merino) Rothm.	Anglais: yellow lupin	52
L. hispanicus Boiss. et reut. Subsp. Hispanicus subsp. Bicolor (Merino) gladst.	*L. rothmaleri* Klink. *L. versicolor* cabal *L. hirsutus* L.		52
L. micranthus Guss.			52

Tableau I.2: Groupe d`espèces de lupin à graines rugueuses avec synonymes botanique, noms vernaculaires et nombre de chromosomes

Espèce	Synonyme botanique	Nom vernaculaire	Nombre de chromosomes
L. cosentinii Guss.	*L. digitatus* Lojac. *L. varius* Caruel *L. pilosus* Murr. *L. pilosus* Murr. Subsp. Cosentinii (Guss.) Rouy et Fouc. *L. pilosus* Murr. Subsp. Digitatus Fiori et paol.		32
L. digitatus Forsk.	*L. tassilicus* Maire *L. pilosus* subsp. Tassilicus (Maire) Quezel et Santa		36
L. princei Harms	*L. hirsutus* L.		38
L. pilosus Murr.	*L. varius* L. *L. varius* L. subsp. Orientalis (Franco et P. Silva)		42
L. palaestinus Boiss.			42
L. atlanticus Gladst.		Lupin d`Atlas	38
L. somaliensis Baker			?

I-3- Le lupin du Maroc

On reconnaît six espèces de lupins au Maroc: *L. albus, L. luteus*, *L. angustifolius, L. consentinii, L. pilosus* et l`espèce *L. atlanticus* qui est endémique au maroc.

I-3-1- Lupinus albus

Le lupin blanc ou *Lupinus albus* est une plante annuelle qui présente des feuilles composées avec cinq à sept folioles et pouvant atteindre un mètre de hauteur. Les fleurs pouvant être de couleur blanche, rose ou bleu (Figure I.1a). Les graines de lupin sont larges, circulaires et de couleur blanche à tendance rosâtre (Figure I.1b) selon la concentration en alcaloïdes. Ses graines sont les plus larges graines des lupins avec 8 à 12 mm de diamètre, 10 à 14 mm de long et 3 à 5 mm d`épaisseur.

La culture des lupins blanc pour la consommation date de l`époque pré-romaine et le temps des grecques (Gladstones, 1970 ; Hondelmann, 1984) et les variétés *L. albus* var. *albus* caractérisées par de faibles taux d`alcaloïdes et une maturité précoce ont été développées en Europe du nord après la seconde guerre mondiale (Hackbarth and Troll, 1956). De nos jours, le lupin blanc est cultivé dans plusieurs pays pour l`alimentation et aussi comme plante ornementale.

Les lupins blancs sauvages *L. albus* var. *graecus* présentent des graines et gousses plus petites que celles des variétés *albus*. La variété graecus est très rare aux balkan et a probablement introgressé avec la var. *albus* au centre des îles grecques où on rencontre des types intermédiaires (Cowling, 1986; Simpson, 1986).

Au Maroc, on rencontre le lupin blanc sur des sols sableux et sablo-limoneux de type acide ou proche de la neutralité.

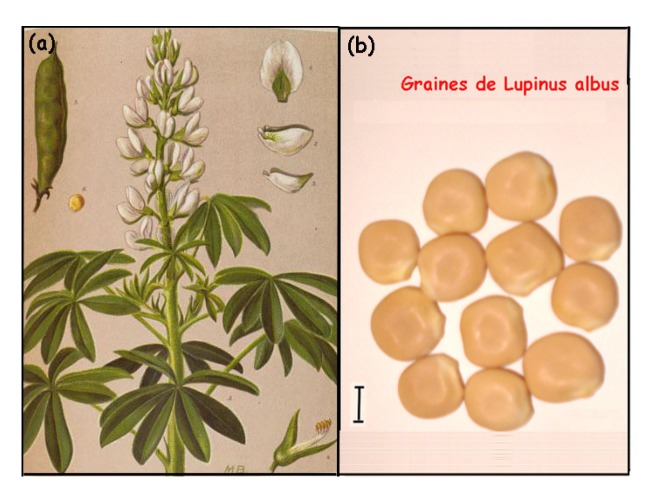


Figure I.1 *: Lupinus albus.* (a) plante avec feuilles, fleurs blanches et gousse. (b) graines. Unité = 0.5 cm**.**

I-3-2- Lupinus cosentinii

Le lupin violet ou *Lupinus cosentinii* est l`une des espèces de l`ancien monde dont le nombre de chromosomes est le plus faible parmi ce groupe avec 2n=32. Les plantes ont naturellement des fleurs bleues à bleu pâle avec des tâches blanches au niveau des marges supérieures (Figure I.2) alors que les fleurs roses ou blanches ont été sélectionnées.

On rencontre *L. cosentinii* dans les régions montagneuses du Maroc et sur les zones côtières surtout au niveau de la chaîne Rabat- Casablanca où on a remarqué un développement massif de cette plante au cours des dernières années.

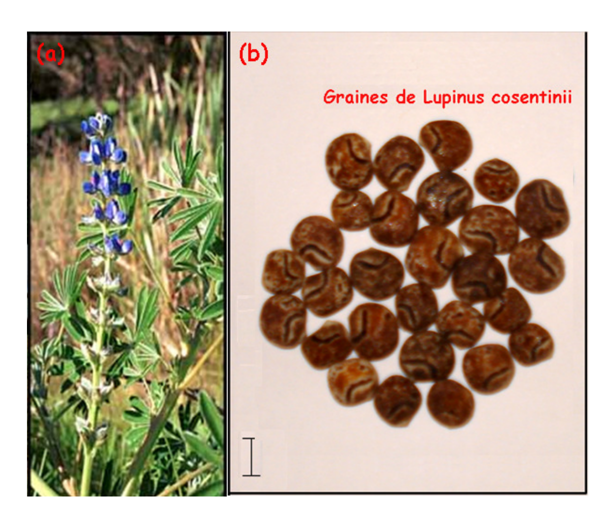


Figure I.2. *Lupinus cosentini*. (a) plante avec feuilles et fleurs de couleur violette, (b) graines. Unité montre 0.5 cm

I-3-3- Lupinus pilosus

Cette plante est caractérisée par des feuilles poilues et les graines les plus larges du groupe du lupin à graines rugueuses et a probablement été sélectionnée pour ce caractère auparavant. Les types sauvages présentent de larges fleurs bleues (Figure I.3) avec des taches blanches et de larges gousses. Les graines sont de couleur marron rouge a rose avec une tache sombre en forme de croissant. Les plantes de cette espèce présentent des inflorescences larges et visibles qui ont intéressé les horticulteurs du nord de l`Europe qui sélectionnent les variétés de jardin. Les types sélectionnés sont caractérisés par un fleurissement précoce et des fleurs blanches ou roses (Clements *et al*, 1996)



Figure I.3. *L. pilosus* montrant les feuilles et l`inflorescence bleue.

I-3-4- Lupinus angustifolius

Cette espèce aussi appelée lupin à feuilles étroites est facilement reconnaissable par son feuillage \`Narrow- leafed lupin\` (Figure I.4a). Ces feuilles sont d\`une largeur de 1.5- 4 mm pour les types sauvages et de 6 mm maximum pour les types cultivés alors que *L. albus* présente 12-20 mm et *L. luteus* 8-15 mm. Des types à larges feuilles et graines (Figure I.4b) ont été sélectionnés en méditerranée et Europe du nord. Les types sauvages présentent de larges graines avec un large spectre de couleur. L\`inflorescence est en grappe et la corolle est de couleur bleue clair ou foncé et teintée de violet. La domestication de *L. angustifolius* a été réalisée en fin des 1920 en Allemagne après la sélection de variétés à faible taux d\`alcaloïdes (Hackbarth and Troll, 1956)

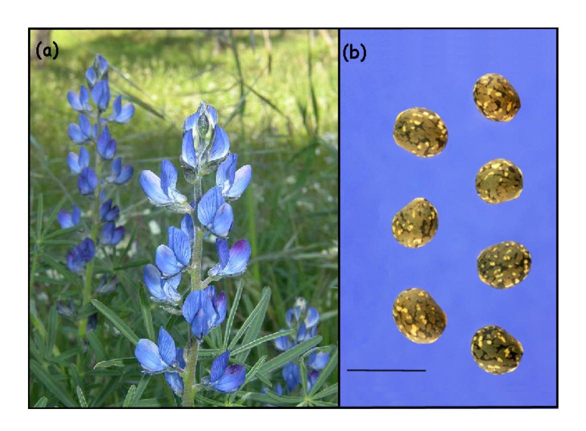


Figure I.4. *Lupinus angustifolius.* (a) plante avec feuilles et fleurs bleues. (b) graines. Unité de 1 cm.

I-3-5- Lupinus luteus

Le lupin jaune ou *Lupinus luteus* est une espèce caractérisée par des plantes à fleurs toujours jaunes (du clair au foncé) (Figure I.5) et qui ont été cultivées comme plantes ornementales (Gladstones, 1998). Les vrais types sauvages sont rarement collectés dans la péninsule ibérique et présentent des plantes à graines petites et fleurissement tardif. Les graines du lupin jaune sont lisses de couleur marron noir sur un fond blanchâtre et peuvent être chez certaines variétés de couleur jaune. Les fleurs sont arrangées de façon régulière sur le racème. Cette espèce est la première à avoir été domestiquée. La culture du lupin jaune doux sur des sols sableux- acides a été un succès en 1950-1960 en Allemagne et en Pologne. La variété polonaise Teo caractérisée par un fleurissement précoce présente une bonne adaptation aux saisons de culture courtes. Les graines du *L. luteus* sont les plus riches graines des légumineuses en protéines (38%) et en acides aminés sulfurés et lysine (Tableau I.3) (Cowling *et al*, 1998).

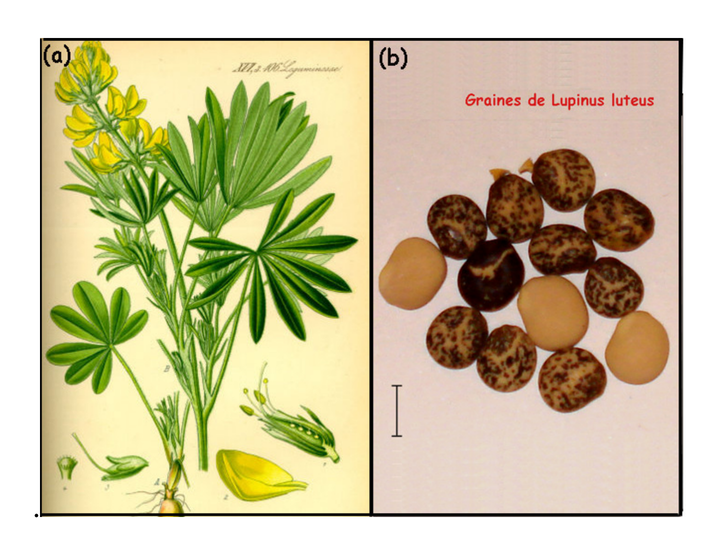


Figure I.5. *Lupinus luteus*. (a) plante montrant feuilles et fleurs jaunes. (b) graines. Unité de 0.5 cm

Tableau I.3: Comparaison de la composition des graines de lupin blanc, bleu et jaune en matières sèche, grasse et en protéines. (Source: ARVALIS/UNIP).

% matière	*Lupin blanc*	*Lupin bleu*	*Lupin jaune*
Matière sèche	*90*	*90.4*	*88*
Matière grasse	*10*	*6.2*	*5.4*
Amidon	*1*	*2.2*	*0.7*
Cellulose brute	*14*	*16.5*	*16.3*
Protéines	*40*	*34*	*43*
Lysine	*1.93*	*1.6*	*2.21*
% Lysine/protéines	*4.8*	*4.7*	*5.1*
Méthionine+cystine	*0.9*	*0.73*	*1.28*
Tryptophane	*0.3*	*0.31*	*0.35*
Matière minérale	*3.9*	*3.5*	*5*
Tanins (total)	*0.4*	*0.3*	*0.3*
Autres fibres et sucres solubles	*30.7*	*37.3*	*29.3*

I-3-6- Lupinus atlanticus

Gladstone (1974) a décrit *L. atlanticus* comme étant une nouvelle espèce malgré sa similarité avec d`autres espèces. Cette espèce est caractérisée par des graines assez large, des fleurs bleues avec un secteur blanc au centre similaires aux fleurs de *L. pilosus*. Le feuillage vert clair est très similaire à celui de *L.* digitatus (espèce cultivée présentant des fleurs bleues). Sa distribution géographique est limitée à l`anti-atlas et aux pieds de montagne du Haut- atlas `foothills` marocains. Des études portées auparavant sur des accessions collectées au nord dans les régions

de Beni mellal ont révélé que ces plantes présentent de larges graines à une germination précoce et rapide et un fleurissement tardif (Cowling *et al*, 1998).

I.4. Phylogénie du Lupin

La grande diversité et la complexité du génome du genre *Lupinus* a été sujet à plusieurs études afin de clarifier en outre l`origine de ce genre. Des études moléculaires et non moléculaires ont permis d`élaborer deux principales hypothèses sur l`origine des lupins.

Une hypothèse basée sur l`utilisation des marqueurs moléculaires à savoir les ADN nucléaire (ITS nrDNA) et chloroplastique (rbcL et trnF) prouvent que les genistées (contenant les *Lupinus*) dans l`ancien monde présentent une origine commune et que les espèces du nouveau monde présentent un centre de diversification secondaire du lupin.

D`autres études non moléculaires proposent des hypothèses controversées pour lesquelles (1) les *Lupinus* n`appartiennent pas aux *Genisteae*, (2) mais dérivent des *Thermopsideae* famille ancestrale du nord de l`Amérique (Plitmann, 1981), (3) les *Lupinus* sont originaires des *Sophoreae* primitifs de l`Asie (Cristofolini, 1989) ou bien encore que (4) les *Lupinus* viennent des *Crotalarieae* du sud de l`Amérique (Dunn, 1971).

La classification hiérarchique du genre *Lupinus* a été abordée par plusieurs auteurs moyennant plusieurs techniques moléculaires.

Ainouche et Bayer (1999) ont utilisé les marqueurs d'ADN ribosomal ou ITS pour analyser la phylogénie du lupin. Kass and Wink (1997) ont choisi de comparer les séquences des régions ITS et le gène chloroplastique rbcL. Talhinhas et *collaborateurs* (2003), ont par contre choisi les marqueurs moléculaires AFLP, ISSR et RAPD pour étudier la diversité génétique et la phylogénie de huit espèces de lupin. Naganowska B. *et al*, 2003; Naganowska B. *et al*, 2006 ont utilisé la composition des ADN nucléaires pour aborder la phylogénie du lupin.

L'ensemble de ces travaux ont permis d'avoir des résultats d'hiérarchisation similaires ou on observe une claire séparation des espèces du nouveau monde et celles de l'ancien.

Le travail le plus récent sur la phylogénie du genre *Lupinus* a été remarquablement traité par Ainouche *et al* (2004). L'étude a concerné 44 espèces de lupin de l`ancien et du nouveau monde. Dans ce travail, les marqueurs ITS se sont montrés plus informatifs que d`autres marqueurs et ont permis de dresser le dendrogramme représenté en Figure I.6. Lors de cette étude Ainouche

propose une hypothèse sur l'évolution du lupin pour laquelle les lupins ont évolué en cinq lineages (A à E). Chaque linéage représente une région géographique définie (A= Amérique de l`Est, B et C= Contour-méditerranéen, C= Afrique du nord, D= l`Ouest de l`Amérique). On note aussi que les lupins du nouveau monde ne forment pas un groupe monophylétique en étant divisés en deux groupes A et E. Par contre, les lupins de l`ancien monde forment 3 clades différents B, C et D représentant les groupes du contour de la méditerranée et `C` qui représente les espèces de l`Afrique du nord.

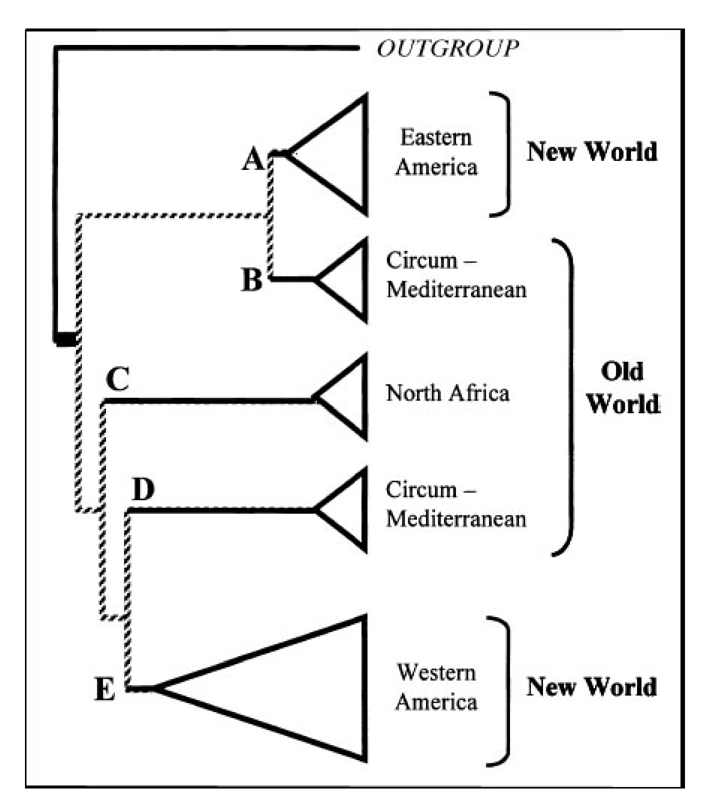


Figure I.6. Diagramme représentant la relation phylogénétique du genre *Lupinus* basée sur les séquences d` ADN ribosomal ITS de 44 taxons de lupin et 5 outgroup. Les groupes identifiés et leurs régions correspondantes sont représentés par des triangles ouverts.

II. Approches de la diversité moléculaire

II.1 Marqueurs moléculaires pour l`étude de la diversité génétique

L`étude de la diversité ou polymorphisme génétique est liée au développement de la biologie qui a permis le développement de plusieurs marqueurs à savoir les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs moléculaires.

Les marqueurs morphologiques et biochimiques ont largement contribué aux études de la diversité chez les plantes. Ces marqueurs présentent des limites majeures en comparaison avec les marqueurs moléculaires. Les marqueurs morphologiques étant polymorphes, peuvent interférer avec d`autres caractères et sont parfois influencés par le milieu.

Les marqueurs biochimiques quant à eux présentent l'inconvénient d'être faiblement polymorphes.

Les marqueurs moléculaires dont le nombre ne cesse de croître avec le développement des techniques de biologie moléculaire (depuis les RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR jusqu'aux SNP) ont fait un large consensus en matière de génétique selon leurs avantages respectifs.

L`utilisation de ces marqueurs est basée sur la notion du bon marqueur moléculaire qui doit être: Polymorphe, codominant, non épistatique et indépendant du milieu. Le choix d`un bon marqueur par le chercheur est aussi basé sur la technicité et le coût de l`expérience qui doivent être abordables en vue d`une manipulation à grande échelle.

Les marqueurs moléculaires ont été largement utilisés chez les animaux et les plantes pour des études de base ainsi qu`appliquées. L`une des utilisations majeurs des marqueurs moléculaires étant l`élaboration physique et génétique des cartes chromosomiques. Ces marqueurs ont contribué aux travaux d`amélioration des plantes (Lefort-Buson *et al*, 1990a et 1990b) en assurant une sélection indirecte moyennant des marqueurs moléculaires liés à des caractères d`intérêt ou quantitative traits loci (QTL). Ces marqueurs présentent l'avantage d'être indépendants à l`environnement d'où la possibilité de les caractériser à différents stades de développement de la plante.

Ces marqueurs ont été aussi adoptés pour toutes les études de génétique des populations et d`écologie (Haig, 1998, pour une revue) permettant l`analyse de la structure et du niveau de la diversité des populations; l`élaboration d`hypothèses sur le flux des gènes et la sélection des

espèces. Les marqueurs moléculaires sont actuellement très utilisés pour la caractérisation des germplasmes et l`identification génétique des espèces en particulier dans le but de la traçabilité.

II.1.1 Les marqueurs RFLP

Les marqueurs RFLP ou polymorphisme de longueur des fragments de restrictions constituent des marqueurs moléculaires basés sur les techniques d`hybridation. Les RFLP sont les premiers marqueurs moléculaires développés et ont été utilisés en 1980 dans la construction de la carte génétique humaine (Bostein *et al.* 1980). Quelques années plus tard, ces marqueurs sont adoptés pour la cartographie du génome végétal (Helentjaris *et al.* 1986) et particulièrement celui du blé *Triticum aestivum* (Chao *et al.* 1989 et Nelson *et al.* 1995) et *Aegilops tauschii* (Lagudah *et al.* 1991 et Gill. B.S. *et al*, 1993).

Cette technique est basée sur la restriction enzymatique des ADN par des endonucléases reconnaissant des séquences courtes spécifiques. Les fragments d`ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d`agarose et ensuite transférés sur une membrane selon la procédure de southern blot. La taille des fragments est déterminée par hybridation des membranes avec des sondes (fragments d`ADN) marquées (Figure I.7). Les sondes peuvent être des séquences d`ADN courtes et simples, de faibles copies d`ADN génomique ou encore des clones d`ADN complémentaire.

Les mutations dans le génome entraînent la modification de certains sites de restriction d`où la génération de différents profils de restriction entre différents échantillons. Chaque fragment de taille différente engendré est considéré comme allèle et peut être utilisé en analyse génétique.

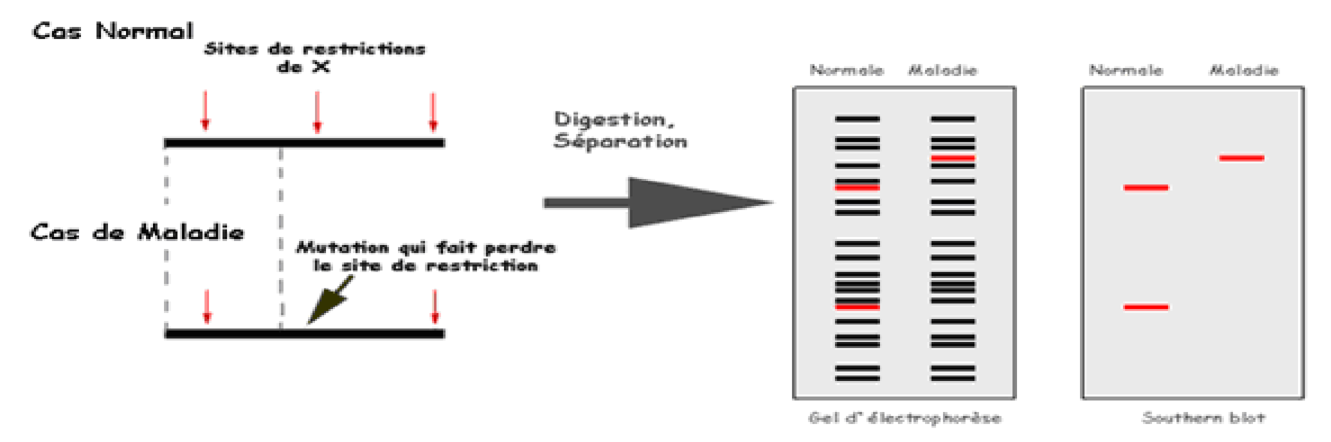


Figure I.7: Schéma présentant les étapes de la technique RFLP sur deux échantillons (normale et maladie).

II.1.2 Les marqueurs RAPD

L`amplification des ADN par les marqueurs RAPD ou `Random amplified polymorhism DNA` (Williams *et al*., 1990; Welsh and Mac Clelland, 1991) constitue l'amplification de séquences sélectionnées au hasard dans le génome par l'utilisation d'amorces non spécifiques. Sa principale variante consiste à utiliser comme amorce un seul oligonucléotide d'une dizaine de bases qui permet d'amplifier par PCR un ou plusieurs segments d'ADN de l'échantillon. Chaque bande de l'amplifiât correspond à l'existence sur chacun des brins d'ADN d'un motif complémentaire à l'amorce.

Sur le plan génétique, la technique RAPD ne fournit pas de marqueurs spécifiques de locus, elle révèle conjointement plusieurs locus qui ne sont pas nécessairement conservés lorsqu'on change de fond génétique. En effet cette technique permet de révéler un polymorphisme de présence /absence. Ainsi pour un locus donné, il y'a ou il n'y a pas d'amplification du fragment.

La technique RAPD jouit d'une grande popularité auprès des généticiens dans le domaine végétal. En effet, cette technique se caractérise par rapport à d'autres techniques (Mini satellites, SSR, RFLP, AFLP…etc.) par sa grande simplicité, rapidité de manipulation et nécessité d`une faible quantité d`ADN, néanmoins les RAPD présentent l'inconvénient d'être faiblement reproductibles. De plus, les marqueurs RAPD permettent de générer un taux élevé de polymorphisme qui a été largement utilisé chez les populations (Chalmers *et al*, 1992) et espèces comme le haricot, le pois et le pois chiche (Nesbitt *et al*, 1995; Weder, 2002). Ces marqueurs ont aussi contribué chez les plantes à la construction de plusieurs cartes génétiques (Reiter *et al*, 1992), à l`identification des cultivars (Nybom, 1994) et aussi aux études phyllogénétiques chez plusieurs espèces comme le palmier dattier et le blé (Gupta *et al*, 2000).

II.1.3 Les marqueurs ISSR

Les ISSR ou Inter Simple Sequence Repeat sont une variante de la PCR développés en 1994 par Zietkiewicz et *collaborateurs*. Cette technique exploite l'abondance aléatoire des SSR dans le génome des plantes. Les SSR étant des séquences répétés en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidique (Figure I.8) générant un système de marqueurs multi locus très intéressant qui permet d`exploiter la distribution abondante et aléatoire des SSRs dans le génome des plantes.

L`intérêt de cette technique est qu`elle ne nécessite aucune connaissance préalable de la séquence utilisée.

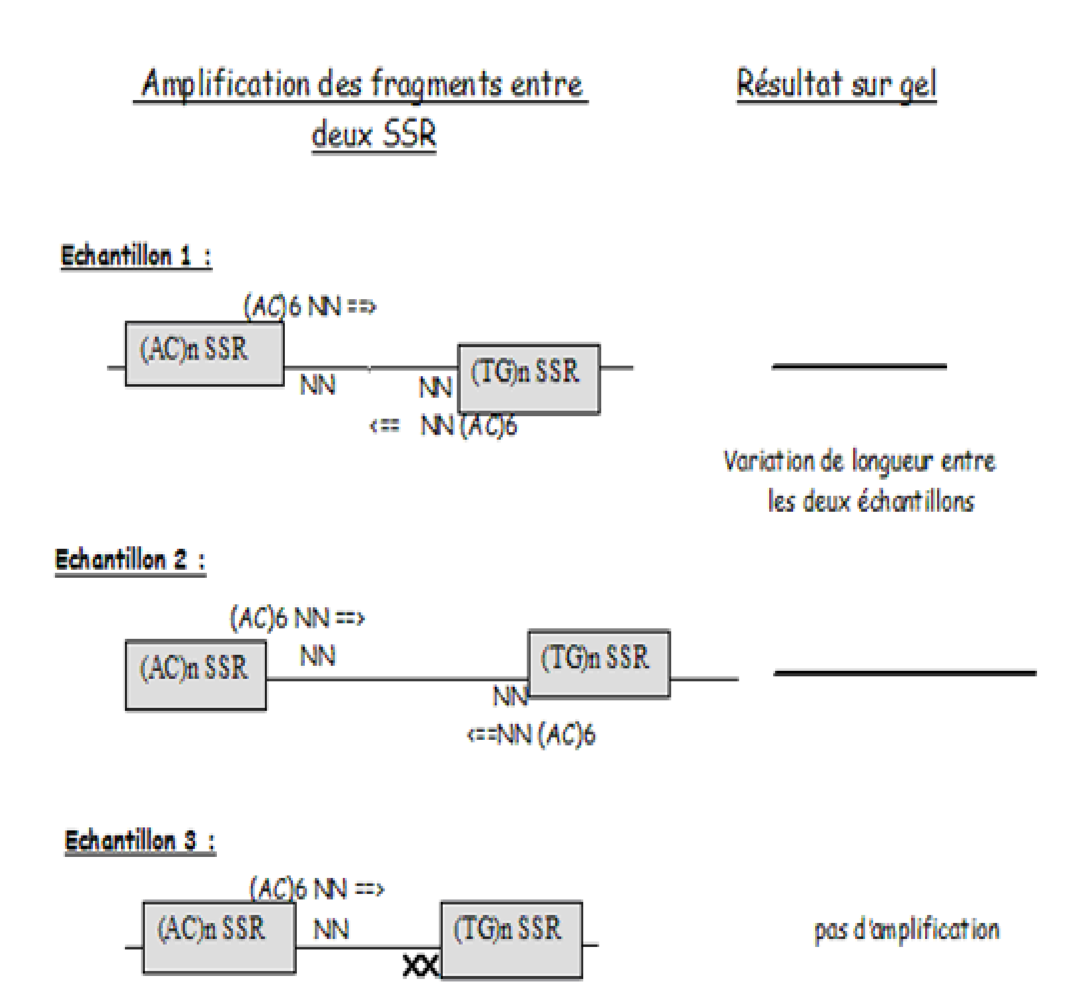


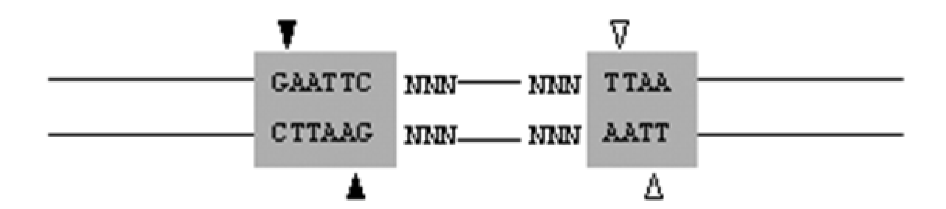
Figure I.8: Schéma présentant le principe et résultat des ISSR chez trois échantillons différents.

Cette technique a connu dans sa méthodologie plusieurs variations avec l`utilisation des gels d`acrylamides ou agarose et la révélation au nitrate d`argent, bromure d`ethidium ou moyennent la radiographie.
Les marqueurs ISSR ont été largement utilisés pour les analyses du polymorphisme génétique au niveau intra- et inter- spécifique chez plusieurs espèces, citons le cas du Mais (Kantety, R. *et al*, 1995), du riz (Joshi *et al.*, 2000) des bananes (Godwin, D., *et al*, 1997), la pomme de terre (Huang & Sun, 2000) du Sorgho (Yang, W., *et al*, 1996) et du lupin (Talhinhas P. *et al*, 2003).

Les ISSR ont été très intéressant pour l`identification de certains cultivars comme dans le cas du *chrysanthemun* (Wolff. K, *et al*, 1995) et encore pour la détermination de l`origine génomique de certaines espèces comme c'est le cas de l`éleusine (*Eleusine corocana*). Ces marqueurs ont contribué à l`évaluation de la diversité génétique chez le genre *Lupinus* et ont permis une séparation claire des espèces du nouveau et de l`ancien monde (Talhinhas, P *et al*, 2003).

II.1.4 Les marqueurs AFLP

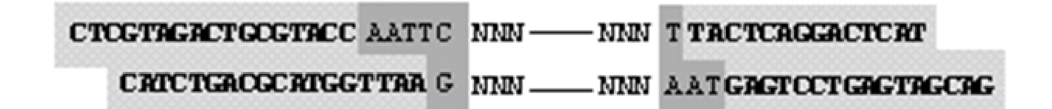
La technique AFLP (Amplified fragments length polymorphism) est une variante de la PCR développée en 1995 par Vos et *collaborateurs*. Cette technique est basée sur la détection par des amplifications sélectives de fragments d`ADN génomique digérés. Les ADN génomique sont doublement digérés par des endonucleases et les fragments obtenus sont sujet à une ligation avec des adaptateurs spécifiques. Les produits de la ligation sont ensuite amplifiés sélectivement moyennant des amorces complémentaires aux adaptateurs utilisés (Figure I.9). Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturé et révélés par radiographie ou au nitrate d`argent. Le Kit des AFLP a été premièrement optimisé chez les plantes à génome de taille petite ($5X10^8$ bp a $6X10^9$ bp) (Ma and Lapitan, 1998). Ces marqueurs se sont révélés très informatifs et ont permis de révéler jusqu`à 16 fois plus de loci que les marqueurs RFLP. Cette technique a été largement utilisée pour la détection du polymorphisme génétique et la détermination des liaisons en analysant des individus de populations isolées.



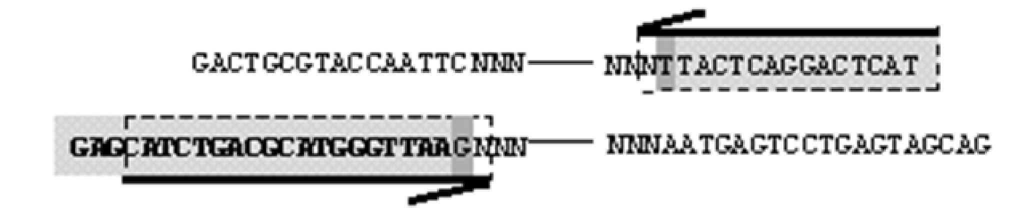
Etape 1. Digestion EcoRI+MseI

AATTC NNN— NNN T
G NNN— NNN AAT

Etape 2. Ligation aux adaptateurs EcoRI/MseI



Etape 3. Préamplification (1 base sélective)



Etape 4. Amplification (3 bases sélectives)

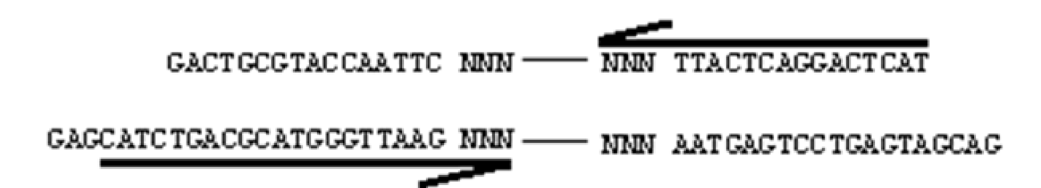


Figure I.9. Les quatre étapes de la technique AFLP. (1) la digestion du génome par EcoRI/MseI. (2) Ligation des fragments digérés par les adaptateurs EcoRI/MseI. (3) La pré-amplification ou PCR 1. (4) La PCR2 ou amplification sélective.

Les AFLP ont été largement utilisés dans l`étude de plusieurs plantes cultivées, comme le cas de l`orge (Becker *et al*, 1995 ; Qi *et al*, 1998 ; Shan *et al*, 1999), le riz (Mackill *et al*, 1996 ; Maheswaran *et al*, 1997), le soja (Maughan *et al*, 1996; Powell *et al*, 1996)…etc.

Les marqueurs AFLP ont contribué à l`étude de la diversité génétique chez huit espèces du genre *Lupinus.* Ces marqueurs ont permis de révéler quatre fois plus de polymorphisme que les marqueurs RAPD et ISSR et aussi de séparer les espèces du nouveau monde et ceux de l`ancien monde (Talhinhas *et al*, 2003). Cette classification a été différente de celle obtenue par les marqueurs ITS (Ainouche et al, 2004) (voir paragraphe I.4)

Les marqueurs AFLP ont été aussi utilisés dans l`étude de la relation phylogénétique entre deux espèces de lupin *L. luteus* et *L. cosentinii* et les résultats obtenus suggèrent que cette technique est très efficace pour la caractérisation du germplasme du Lupin (Qiu *et al*, 1995).

II.1.5 Les marqueurs Microsatellites ou SSR

Les microsatellites ou séquences simples répétées (SSR) sont des locus polymorphes constitués de séquences répétées en tandem (1-6 bp). La variation du nombre de répétitions du motif de base constitue la base du polymorphisme. Les SSR sont ``ubiquitaires``chez les procaryotes et les eucaryotes et sont présents même dans les génomes bactériens les plus petits (Field and wills, 1996; Hancock, 1996). Les microsatellites peuvent être présents au niveau des séquences non codantes et aussi codantes.

La technique SSR se base sur l`amplification par PCR de l`ADN génomique moyennant des amorces spécifiques flanquant les séquences répétées et la séparation des amplifias par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les SSR se sont révélés des marqueurs moléculaires très utiles dans la sélection assistée par marqueurs, l`analyse de la diversité génétique et l’analyse de la génétique des populations chez plusieurs espèces (Gupta 2000, Budak *et al*, 2003).

II.1.6. Les marqueurs SNP

Les marqueurs SNP (single nucleotide polymorphism) sont une source importante de polymorphisme de l`ADN. Le changement d`un nucléotide par un autre est un processus biallelique codominant. Ceci peut être un processus synonyme n`entraînant pas de changement de l`acide aminé, ou encore non synonyme entraînant la substitution d`un acide aminé par un autre. Le changement au niveau d`un nucléotide peut aussi provoquer la création/abolition d`un site d`épissage ou encore un stop précoce (mutation non sens).
Chez les plantes, les SNP sont des marqueurs génétiques utilisés dans plusieurs études de populations, dans le marquage des germplasmes, dans la cartographie de gènes et dans les associations génotype/phénotype (Giancola S. *et al*, 2006).
Chez les plantes, le maïs est considéré très polymorphe avec une moyenne d`un SNP par 104 pb (Tenaillon *et al*. 2001); le blé présente un SNP tous les 200 bp (Ravel *et al*. 2004); le soja présente un SNP par 273 pb (Zhu *et al*. 2003); le colza présente un SNP tous les 600 pb (Fourmann *et al*. 2002) et chez *Arabidopsis thaliana*, un SNP est rencontré tous les 336 pb (Schmid *et al*. 2003). Le niveau de variation dépend hautement du locus considéré et peut être encore plus important.

II.2 Analyse de la variabilité

L`étude de la variabilité moyennant les marqueurs moléculaires cités précédemment permet de générer des résultats sous forme de tableaux complexes avec un ensemble de variables nombreuses et souvent de typologie diverses.
Les méthodes statistiques uni- ou multi variées permettent l`analyse de la similarité et de la diversité entre les entités étudiées ainsi que le calcul des paramètres génétiques des différentes populations.
Les résultats obtenus peuvent être aussi résumé et classés en groupes grâce à des techniques descriptives telles que les analyses factorielles et les méthodes de classifications.

II.2.1 Méthodes de classification

La classification hiérarchique *ou* hierarchical clustering permet le regroupement ou le clustering d`un ensemble d`échantillons en se basant sur la notion de distance. En effet, le clustering consiste en le regroupement des échantillons en groupes/ sous-groupes ou clusters partageant des caractéristiques communes. Les méthodes de classification sont des méthodes non paramétriques ne considérant qu`une seule hypothèse qui stipule que plus deux entités sont similaires plus elles ont de chance à faire partie du même groupe. Pour réaliser un bon clustering nous devons choisir le coefficient ou indice de similarité adéquat. Celui-ci, dépend essentiellement du type de données à analyser. On distingue ainsi les indices de similarités binaires traitant les données discrètes de type (présence/absence) et les indices de similarités quantitatifs. Ces indices sont aussi classés selon qu`ils traitent ou pas la co-occurrence du zéro ou double absence comme étant une ressemblance. On parle ainsi d`indices symétriques pour le cas des indices qui considèrent la double absence comme de la double présence, par opposition aux autres indices asymétriques.

a- Indices de similarités binaires symétriques :

L`indice représentant cette catégorie est l`indice de SOKAL et MICHENER qui représente le nombre de présences ou d'absences simultanées divisé par le nombre total de relevés.

b- Indices de similarités binaires asymétriques :

Les indices représentant cette catégorie sont l`indice de Jaccard et Sorensen. L`indice de JACARD, le plus utilisé, représente le nombre de cas de présences simultanées des deux échantillons considérés, divisé par le nombre de cas où au moins l'un des deux est présent. L`indice de SORENSEN est assez similaire à l`indice de JACARD, avec une pondération par 2 du terme de co-occurrence.

A partir des indices de similarités binaires on peut déduire les indices de distances D comme suit: D=1-S.

c- Indices de similarités quantitatifs symétriques:

L'indice fait le rapport entre le nombre de descripteurs ayant le même état pour les deux objets et le nombre total de descripteurs. Exemple de l'indice d'Estabrook et Rogers et l'indice de Gower.

d- Indices de similarités quantitatifs asymétriques:

Dans cette catégorie deux indices sont fréquemment utilisés : l'indice de Steinhaus, et la similarité du khi carré.

Pour le cas des données quantitatives, on distingue deux catégories d`indices de distance selon leurs propriétés géométriques:

- *Les indices de distances métriques* qui obéissent aux quatre propriétés suivantes :

1- Si deux entités a et b sont similaires (a=b), la distance entre a et b est nulle: D (a,b)=0.
2- Si les deux entités a et b sont différentes, la distance entre elles est supérieure à 0: D(a,b)>0.
3- La distance entre les deux entités est la même dans les deux sens, D(a,b) = D(b,a).
4- Si on considère trois entités a, b et c alors D(a,b) + D(b,c) est plus grand ou égal à D(a,c).

La plus courante des distances métriques est la distance euclidienne. Dans un espace euclidien, chaque variable est considérée comme une dimension et les différents objets se positionnent selon les valeurs de ces variables. Ces mesures n`ont pas de valeurs maximales et dépendent de l`échelle des variables. En effet, ces valeurs augmentent avec le nombre de variables. Pour ceci, le calcul des distances euclidiennes nécessite la réduction des variables comme le cas des analyses en composantes principales (ACP).

- *Les indices de distance semi métriques*, sont des indices qu`on ne peut pas positionner dans un espace euclidien. Exemple de la distance de Bray et Curtis.

Une étape aussi très importante de la classification est la génération de l`arbre et le calcul du bootstrap ou la vérification de la robustesse des différents nœuds de cet arbre.

II.2.2 Analyse factorielle

Les analyses factorielles fournissent un moyen pour décrire l`information générale en considérant les caractères étudiés dans leur ensemble ainsi que les inter-correlations entre les caractères et leurs effets sur la structuration de la population.

Les analyses factorielles ont été développées en sociologie, économie et psychologie avec des données souvent redondantes. Les plus communément utilisées des analyses factorielles sont l`analyse en composante principale (ACP) et l`analyse factorielle des correspondances (AFC) :
Ces analyses factorielles permettent la représentation d`une population décrite par un ensemble de caractères dont les modalités sont quantitatives (mesures continues), pour une ACP et qualitatives pour une AFC. Les analyses factorielles permettent de réaliser un décodage et une simplification des données par ajustement matriciel. On obtient alors un tableau plus petit résumant le contenu du tableau initial, ou encore on remplace un grand nombre de variables par un plus petit nombre de variables explicatives appelées ‘‘des facteurs’’. Cette analyse factorielle permet de convertir les tableaux de données en un nuage de points dans un espace de `n` dimensions généralement supérieure à 3. Le nuage de points est défini par les distances entre les points et la masse affectée à chaque point. Un ajustement du nuage permet de déterminer l`axe qui restitue au mieux la forme géométrique et massique du nuage et constitue le premier axe d`inertie ou premier axe factoriel du nuage. L`axe orthogonal au premier axe présente le deuxième axe factoriel et ainsi de suite pour les dimensions 3. La morphologie du nuage et la répartition des points permet une meilleure lecture de l`information des données.

L`analyse factorielle des correspondances AFC a été proposée par Benzecri et *collaborateurs* (1973). L`AFC est basée sur l`utilisation de la métrique chi-deux. Elle sert en particulier à déterminer et hiérarchiser les dépendances entre les lignes et les colonnes d`un tableau. Les analyses d`AFC sont généralement complétés par des essais de classification ascendante hiérarchique (CAH) qui permettent de construire des arbres de classification des lignes ou des colonnes.

L`analyse en composantes principale ACP a été mise au point par Karl Pearson en 1901 en tant qu`une technique de réduction de dimensionnalités. Cette méthode d`analyse de données permet la réduction du nombre de variables et considère les axes qui représentent le mieux les corrélations entre les variables aléatoires. L`ACP est considérée comme un outil de compression linéaire.

III- La génomique structurale et fonctionnelle: méthodes et applications

Actuellement, l`un des défis majeurs du chercheur est la compréhension des mécanismes complexes chez les organismes vivants. Les phénomènes tels que la croissance, le développement et l`adaptation aux stress en particulier le stress hydrique nécessitent une bonne compréhension et analyse de l`information portée par le génome. Ceci implique deux disciplines piliers de la biologie moléculaire : la génomique structurale et la génomique fonctionnelle.

La génomique structurale nous permet de déchiffrer et extraire l`information portée par le génome et par les protéines. La génomique fonctionnelle nous permet par contre de comprendre les modalités de régulation et d`interaction de cette information.

III.1. La génomique structurale

Cette discipline est basée essentiellement sur le séquençage et l`identification des gènes. La définition des structures introns-exons et régions inter- géniques est une étape cruciale de la génomique structurale. Cette identification s`effectue par comparaison des séquences avec les séquences d`ADNc et aussi par l`utilisation de certains programmes bioinformatiques de prédiction.

Depuis la découverte de l`ADN double hélice par Watson et Crick en 1953, les études portant sur l`ADN se sont succédées. Et depuis le séquençage du premier génome d`*Haemophylus influenzae* en 1995, plusieurs organismes ont été séquençés.

III.1.1 Le séquençage systématique

Le séquençage est un moyen de décodage des acides nucléiques permettant la découverte des gènes d`un organisme.

Le séquençage de l`ADN a été inventé aux années 70 par deux équipes travaillant séparément, l`équipe de Walter Gilber et l`équipe de Frederick Sanger. L`équipe américaine et allemande ont reçu le prix Nobel de la chimie en 1980. Les méthodes de séquençage proposées sont basées sur des techniques différentes. En effet, La méthode de Sanger est basée sur la synthèse enzymatique sélective alors que celle de Gilbert est basée sur la dégradation chimique sélective. Actuellement la majorité des séquençages réalisés se basent sur la méthode de Sanger. Le séquençage de génomes tire avantage des techniques de biologie moléculaire ainsi que des outils de la bioinformatique. Ainsi, on reconnaît deux grandes techniques de séquençage basées essentiellement sur la fragmentation partielle du génome et le clonage des fragments génomiques

dans des vecteurs de clonage (Figure I.10). Selon que les clones sont ordonnés avant ou après le séquençage on distingue:

1- La méthode de séquençage par ordonnement hiérarchique: cette technique est basée sur le séquençage de fragments digérés après leurs classements. Les fragments génomiques digérés sont de grande taille 50~200 kb et sont clonés dans des vecteurs artificiel comme les chromosomes artificiels bacteriens (BAC).

2- La méthode globale ou shotgun est basée sur le séquençage des fragments génomiques dans un ordre aléatoire. Les séquences des différents clones seront ordonnées par chevauchement à l`aide des programmes bioinformatiques. Cette technique a été popularisée par le séquençage de génomes bactériens, du génome de la drosophile et du génome humain. La technique shotgun présente l`avantage d`être plus rapide et moins coûteuse que la première technique.

Historique

Le premier séquençage effectué a concerné le génome du bactériophage Φ-X174 publié en 1977 par l`équipe de Sanger. En 1995, le séquençage du génome de la première cellule bactérienne *Haemophilus influenzae* avec 1.8 millions de paires de bases (Fleischmann, R. D. *et al*. (1995)).
En 1990, se lance le grand projet du génome humain *Homo sapiens* dirigé par James D. Watson à l`Institut National de santé (NIH) aux Etats Unis d`Amérique. Plusieurs chercheurs du royaume unis, de France, d’Allemagne, du Japon et de la Chine ont participé à ce projet. La première version de séquençage a été annoncée en 2000 et la version complète a été publiée en Avril 2003. Le séquençage a permis d`identifier entre 20000 et 25000 gènes qui sont accessibles pour les études biologiques (Venter J.C *et al*, 2001).
Le nématode *Caenorhabditis elegans* est le premier organisme pluricellulaire séquençé. Il a été publié en 1998 avec toutefois quelques lacunes qui ont été couverte en 2002 (Stein *et al*, 1998). En 2003, on annonce la séquence d`un nématode apparenté, le *C. briggsae*. Ceci a permis d`effectuer une étude de génomique comparative entre les deux espèces de nématodes (Stein, L. D. *et al.* (2003).
Chez les plantes, plusieurs espèces ont été séquençées (Tableau I.4) avec *Arabidopsis* qui est la première dont le génome a été complètement séquençé en décembre 2000. Le séquençage a

couvert 115,4 Mb d`un génome de taille totale de 125 Mb (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

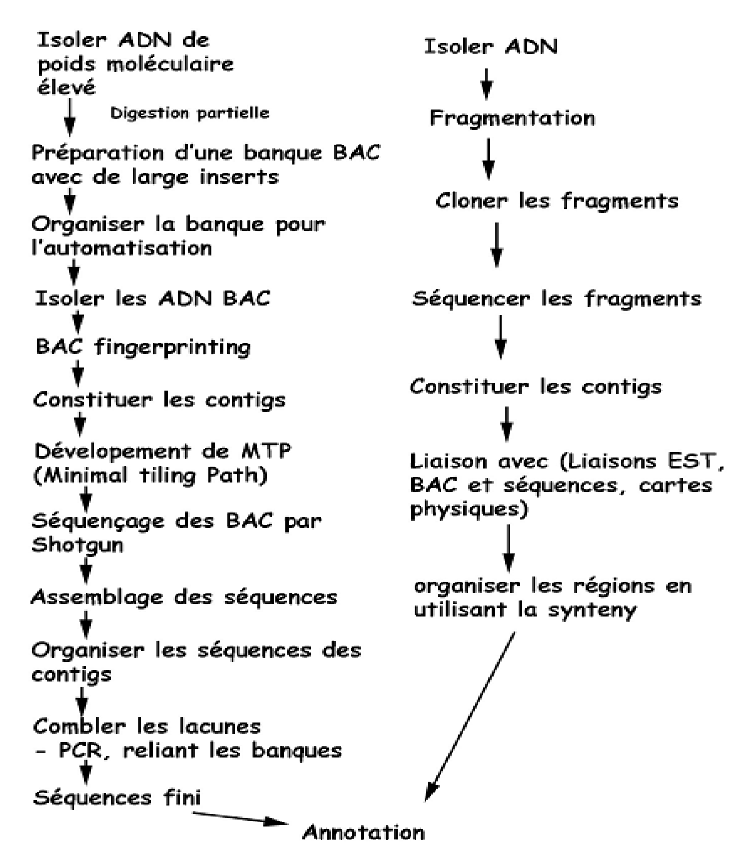


Figure I.10. Schéma représentant les deux principales voies de séquençage du génome.

Tableau I.4. Exemple de quelques espèces de plantes dont le génome a été séquençé; taille du génome couverte par le séquençage et nombre de gènes identifiés. *(Recherche effectuée Décembre 2008)*

Organisme	**Taille du génome**	**Nombre approximatif de gènes**	**Date d`achèvement**
Arabidopsis thaliana Ecotype: Columbia	120 Mb	25,490	2000 (Nature, 2000)
Cyanidioschyzon merolae Strain:10D	16.5 Mb	5,331	2004 (Matsuzaki *et al*, 2004)
Oryza sativa ssp indica	420 Mb	32-50,000	2002 (Goff SA *et al*, 2002)
Oryza sativa ssp japonica	466 Mb	46,022-55,615	2002 (Yu J *et al*, 2002)
Ostreococcus tauri	12.6 Mb		2006 (Derelle E. *et al*, 2006)
Physcomitrella patens	500 Mb	39,458	2008 (Rensing SA *et al*, 2008)
Populus trichocarpa	550 Mb	45,555	2006 (Tuskan GA *et al*, 2006)
Vitis vinifera	490 Mb	30,434	2007 (Jaillon O *et al*, 2007)
Zea mais	2500 Mb	50,000-60,000	2008 (en cours de publication)

III.1.2 Séquençage d'étiquettes de séquences exprimées (EST)

Le séquençage d`EST est une variante du séquençage ciblant en particulier les séquences codantes et ignorant les séquences non transcrites. Cette technique permet d`avoir de l`information indépendamment de la taille du génome étudié. En comparaison avec le séquençage systématique, le séquençage d`EST permet d`accéder aux séquences codantes avec un effort et un coût moindres.

En pratique on clone les ADNc issus de la rétro- transcription des ARNm dans des vecteurs plasmidiques de clonage formant ainsi des banques d`ADNc. Les clones sont partiellement séquençés sur l`une des extrémités 3` ou 5`. Les séquences obtenues sont classées en groupes correspondant au même gène on parle de "contigs". Ainsi, on peut obtenir la séquence complète d`un gène par la combinaison des séquences de plusieurs clones.

Actuellement, la banque de gènes GenBank avec sa division spéciale pour la banque de données EST comprend près de 52 millions d`EST (Tableau I.5) (Adams M. *et al*, 1991). D`autres bases de données pour les EST contigs sont disponibles sur le web, citons le `TIGR gene indices`

(http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html) (Lee Y. *et al*, 2005), `Unigene` (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene) (Stanton JA *et al*, 2003) et `STACK` (Christoffels A *et al*, 2001).

Chez *Lupinus albus* il existe actuellement 8418 séquences EST disponibles dans GenBank. Ces séquences ont été isolées de racines proteoïdes développées sous stress phosphorique. La banque EST du lupin blanc se divise en deux catégories: une banque EST de 7 à 10 jours après émergence JAE et la banque EST de 12 à 14 JAE. Plusieurs de ces séquences EST demeurent encore sans annotation. Il existe aussi une banque d'EST intéressante du lupin blanc non encore publiée et disponible au laboratoire du professeur Vance (University du Minnesota, saint paul, USA).

Tableau I.5. Nombre d`étiquettes EST disponibles et connues chez quelques espèces de plantes en comparaison avec *Caenorhabditis elegans* et *Homo sapiens*. (Recherche effectuée le 25/12/2008). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/

Espèce	**Nombre de séquences EST disponible dans Genbank.**
Homo sapiens	8,163,898
Zea mays	2,018,337
Arabidopsis thaliana	1,526,124
Glycine max	1,386,618
Lupinus albus	8418
Lupinus angustifolius	388
Triticum aestivum	1,051,304
Orysa sativa japonica	985,283
Caenorhabditis elegans	352,044
Medicago truncatula	260,238
Orysa sativa indica	201,453
Populus trichocarpa	89,943
Phaseolus vulgaris	83,448
Pinus pinaster	27,847
Medicago sativa	12,072
Triticum monococcum	11,190
Pinus sylvestris	660

III.2 La génomique fonctionnelle

L`objectif de la génomique fonctionnelle est la compréhension du fonctionnement des différents composants du génome. La forme, la fonction et le développement des organismes dépendent de l`information apportée par plusieurs processus liés à l`activité biologique d`une cellule ou d`un tissu et aussi de la combinaison de la fonction de l`ARN, protéines et métabolites (Figure I.11).

Le génome étant identique au niveau de toutes les cellules d`un organisme, il est considéré comme le support de l`information de base. Le génome, avec ses séquences codantes et non codantes est très complexe et nous offre beaucoup d`informations utilisées à plusieurs niveaux à savoir en évolution, diversité…etc. L`ensemble des régions de l`ADN transcrites en ARN constitue le transcriptome. Le transcriptome comprend donc toutes les séquences d`ADN formant les composants de l`ARN d`un organisme. Sachant qu`une partie seulement de l`information contenue au niveau de l`ADN est transcrite en ARN, le transcriptome est moins compliqué que le génome. Les produits de la traduction du transcriptome constituent le protéome. Sachant que seule une partie des ARN est traduite en protéines, le protéome est moins compliqué que le transcriptome. Néanmoins des modifications post-traductionnelle peuvent augmenter la complexité du protéome. Les protéines dont le rôle est la synthèse des métabolites primaires et secondaires forment donc le métabolome.

L`ensemble de ces modalités de mesures ont pour objectif la quantification des différents processus biologiques et l`amélioration de notre compréhension de la fonction des gènes et protéines ainsi que leurs interactions.

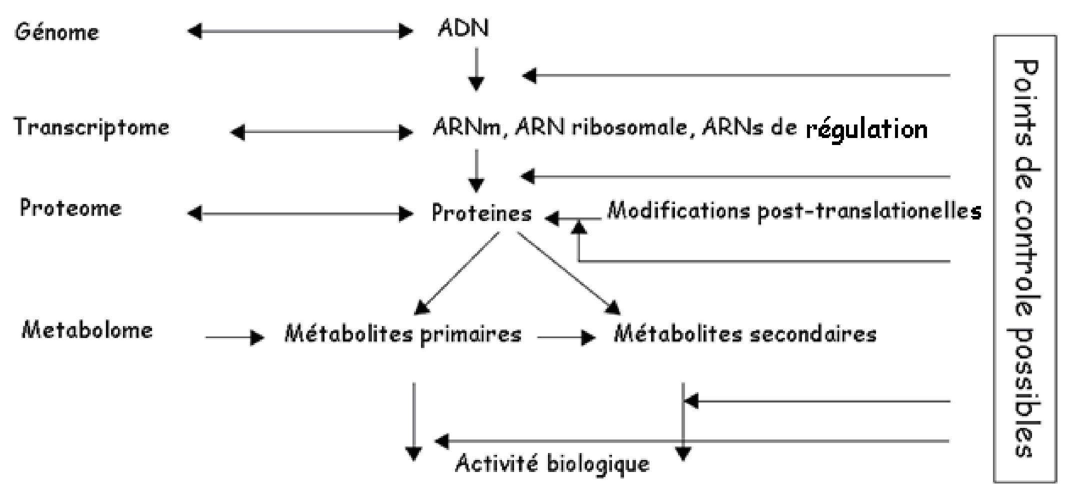


Figure I.11. Les différents niveaux de contrôle des processus cellulaires.
(Christopher A. cullis, plant genomics and proteomics, 2004).

III.2.1 Analyse du transcriptome:

L`étude du transcriptome permet l`analyse de l`expression d`une masse de gènes à travers une variété de conditions biologiques. L`utilisation des techniques de profilage transcriptionnel permet d`analyser l`expression des gènes dans différents tissus, à des moments particuliers et en réponse à différents stimuli ou après un traitement particulier. Les techniques de profilage transcriptionnel peuvent être classées en deux catégories: la première basée sur le séquencage comme le cas de l`analyse en série de l`expression ou SAGE et aussi du séquencage par la technologie 454. La deuxième catégorie est basée sur des techniques d`hybridation, exemple des puces à ADN.

La méthode SAGE a été mise au point et publiée en 1995 par Dr. Victor Velculescu du centre d`oncologie de l`Université de John Hopkins. Cette technique est basée sur l`extraction des ARNm (étiquettes) de différents échantillons, la synthèse des ADNc correspondant et leurs digestion par des enzymes de restriction. Les étiquettes sont ligués en une seule séquence qui est cloner et séquencer. Les séquences obtenues sont analysées in-silico pour déterminer le nombre d`occurrences de chaque étiquette dans les échantillons testés.

La technologie 454 est une des nouvelles technologies de séquencage intégrant haut débit et rapidité. Elle est basée sur le pyroséquencage avec la synthèse d'ADN cible en temps réel avec l'ajout séquentiel et dans l'ordre des bases. Chaque base est marquée par un fluorophore différent dont le signal est mesuré par bioluminescence à l'aide d'une caméra. L'ordre d'incorporation de ces bases sur les l'ADN complémentaire de la cible néosynthétisée permet de déduire la séquence et sa lecture après séquencage (Lamoril *et al*, 2008). Cette technologie permet le séquencage de 20 millions de bases en un cycle de quatre heures.
Cette technologie est très utilisée pour le séquencage des génomes entiers, le séquencage en profondeur ou ultra deep séquencing de gènes cibles et aussi pour les analyses de l'ARN.

Les puces à ADN sont aussi appelées puces à gènes, bio puces, DNA chip, DNA-microarray ou biochip (Schena *et al.*, 1995; Stears *et al.*, 2003). Le principe de fonctionnement d`une puce brevetée a été présenté en 1988 par Edward Southern et ce n'est qu`en 1995 qu`a eu lieu le développement des puces à ADN par Davis et Brown. La commercialisation de la première puce

à ADN a eu lieu en 1996 par l`affymetrix. Les puces à ADN présentent des molécules d`ADN sur du verre, plastique ou silicum. Le principe de cette technique est basé sur des réactions d`hybridation complémentaires entre les brins d`ADN fixes et des ARN de l`échantillon à tester (ARN rétro transcrit en ADNc). Aujourd`hui, on commercialise des puces à ADN avec le génome entier de plusieurs espèces (*Arabidopsis thaliana*, soja, …etc).

Ces techniques basées essentiellement sur les rapports d`hybridation définis par l`abondance potentielle du transcrit présentent une limite majeure pour les gènes avec un nombre de copies faible (Benfey P., 2006). Pour ceci, les résultats des techniques de profilage transcriptionel doivent être vérifiés par d`autres techniques telles que l`analyse des gels d`ARN (Van Zhong and Burns, 2003; Parisi *et al*., 2004), les PCR quantitatives (Leonhardt *et al*., 2004), les expériences de gènes reporteurs ou encore les tests d`hybridation *in situ*.

Chez le lupin blanc, une étude du transcriptome par l`utilisation de puces à ADN a contribué à la compréhension de l`adaptation des plantes à la carence phosphorique (-P). 2102 ESTs préalablement isolés à partir de racines proteoïdes (-P) du lupin blanc ont été analysés et ont permis:

(a) l'identification de 35 gènes surexprimés à différents stades de développement des racines proteoïdes cultivées en absence de phosphore.

(b) la génération d'un profil d`expression différentiel en condition de –P au niveau des racines proteoïdes, des racines normales et des feuilles.

Les gènes surexprimés sont supposés être impliqués particulièrement dans l`acquisition et l`assimilation du phosphate inorganique Pi, du carbone et des métabolites secondaires et dans les processus de développement (Uhde-stone *et al*, 2003).

III.2.2 Fonction des gènes

L`un des soucis majeurs des biologistes aujourd`hui est la compréhension de la fonction des gènes. Ceci, nécessite d`abord l`identification des gènes grâce aux progrès de la génomique structurale et des outils de la bioinformatique. Néanmoins pour analyser comment l`information portée par ces gènes est transcrite, régulée et traduite, des techniques liées à l`ingénierie des plantes s`impose. En pratique, afin de comprendre la fonction d`un gène on manipule l`expression de ce gène. L`altération de la transcription des gènes se fait généralement au niveau transcriptionnel (mutation des gènes) ou post transcriptionnel (ARN d`interférence) et grâce à l`utilisation de la transgenèse.

III.2.2.1. La transgenèse

La transformation génétique consiste en l`introduction de matériel génétique étranger (un ou plusieurs gènes ou transgènes) dans un organisme vivant entrainant la modification du matériel génétique de cet organisme (organisme génétiquement modifié). Le phénomène de transformation génétique a été découvert en 1928 par Frederick Griffith. Ce phénomène très commun chez les bactéries est un élément important de l`évolution des espèces.

La transformation génétique des organismes vivants en particulier les plantes a été largement développée depuis l`identification de l`*Agrobacterium tumefaciens* en 1977.

La transgenèse est un mécanisme largement utilisé en agroalimentaire et en industrie pharmaceutique et particulièrement pour l`étude de la fonction des gènes.

La transgénèse nécessite le choix du transgène, un gène d`intérêt ou un gène dont on veut connaitre la fonction. L`intégration du transgène au sein de l`organisme vivant utilise plusieurs techniques de transformation génétique. Les méthodes de transformation génétique peuvent être classées en méthodes directe et indirecte.

La transformation génétique directe assure la pénétration du transgène dans l`organisme à transformer sans le recours à aucun vecteur. On cite l`élèctroporation, la micro injection, la biolistique ou le bombardement de particules et le transfert moyennant le Poly Ethylène Glycol (PEG).

La transformation indirecte nécessite par contre l`utilisation de vecteurs de transformation tels que les virus et les bactéries. Actuellement, la plupart des transformations génétiques des plantes utilisent les *Agrobacterium*. On note l`*Agrobacteriun tumefaciens* qui est responsable de la galle du collet ou "Crown gall" des plantes et l`*Agrobacterium rhizogenes* qui induit le chevelu racinaire ou "Hairy roots". Seule la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenese* sera discutée en détail dans ce chapitre.

L`*Agrobacterium rhizogenes* est une bactérie Gram négative appartenant à la famille des *Rhizobiaceae.* Cette bactérie est capable de transférer à la plante son ADN T-DNA à partir de son plasmide Ri-plasmide à travers des blessures. Le Ri T-DNA contient des gènes *root locus (rol)* responsables de la prolifération racinaire.

A l`état naturel l`infection de la plante par *A. rhizogenes* est stimulée par la synthèse de composés phénoliques (comme l`acetosyringone) par la plante. Ce système de transformation

permet de générer des plantes dites chimères. Ces plantes présentent un système de chevelu racinaire lié à une partie aérienne non transformée. La génération des plantes transgéniques est de l`ordre de quelques semaines d`où l`avantage par rapport à la transformation par *A. tumefaciens* qui nécessite 4 à 6 mois pour générer des plantes transgéniques. Cette technique est très bien adaptée aux procédures basées sur l`utilisation de l`ARN d`interférence pour étudier la fonction des gènes (Limpens *et al.* 2004); dans les analyses fonctionnelles de promoteurs (Boisson-Dernier *et al.* 2005) et pour les tests de complémentation des mutants de plantes avec les gènes candidats liés au système racinaire (Endre *et al.* 2002; Levy *et al*. 2004).

Néanmoins, la transformation par *A. rhizogeneses* présente une limite majeure, du fait que la partie aérienne est non transformée, la génération de plantes transgéniques par multiplication végétative demeure difficile. Exception faite de quelques plantes comme *Medicago truncatula* dont on a réussi à générer de nouvelles plantules à partir des racines transgéniques (Crane *et al.*, 2006).

Des essais ont été réalisés par l`équipe de Vance C. (Université du Minnesota, Saint Paul, USA) à partir de mutants Ri T-DNA de lupin blanc afin de générer des plantules transgéniques. Les tests de culture *in vitro* des racines transgéniques (RNAi) ont permis d`obtenir des cals. Les cals ont été transférés sur un milieu riche en cytokinine d`où la différenciation visible de l`embryon et des racines, mais la génération d`une plantule entière n'a pas été réussie (Uhde-stone *et al*, 2005).

L`une des étapes clés de la réussite de la transformation est le bon choix de la souche d`*Agrobacterium* à utiliser. Les souches à faible virulence comme Arqua-l ou K599 permettent de générer un faible nombre de racines transgéniques et avec une morphologie et croissance similaires aux racines non transformées (Quandt *et al*., 1993; Collier *et al*., 2005). D`autres souches comme MSU440 et R1000 sont considérées à grande virulence. La souche A4T d`*A. rhizogenese* est très bien adaptée pour la transformation génétique du lupin blanc.

III.2.2.2 Mutation de gènes

Les mutations sont des processus naturels clés du processus évolutif des organismes vivants. Elles occurrent naturellement après des erreurs au cours de la division cellulaire de l`ADN ou après exposition aux agents mutagènes.

Les mutations peuvent être intentionnellement provoquées par les scientifiques pour l`étude de la fonction des gènes qui est déduite à partir du phénotype obtenu. Les études de mutations ont

contribué à la compréhension du développement des plantes et la régulation de la formation des organes.

Les études de la fonction des différents gènes d`*Arabidopsis thaliana* a été possible grâce aux études de mutations au niveau de ces gènes. Les mutants T-DNA d`*Arabidopsis thaliana* pour l`ensemble des gènes identifiés sont disponibles dans les banques de mutants. Citons quatre gènes impliqués dans la morphogenèse racinaire définis moyennant des mutations de type T-DNA. La mutation "*short-root" SHR* entraine l`altération de la structuration racinaire radiale ainsi qu`une croissance déterminée de la racine au lieu d`une croissance indéterminée. Les mutations *Cobra*, *Lion`s tail* et *Sabre* entrainent par contre une expansion cellulaire anormale au niveau des racines (Benfey P. *et al*, 1993).

III.2.2.3 Silençage post- transcriptionnel (ARNi)

L`ARN d`interférence ou ARNi est un mécanisme par lequel l`expression de gènes est inhibée au stade de la traduction. L`ARNi est une partie vitale de la réponse immunitaire contre les virus et autre matériel génétique étranger particulièrement chez les plantes; il prévient contre l`auto propagation par les transposons.

L`ARNi a été découvert par l`équipe de Rich Jorgensen en essayant de modifier la couleur de la fleur pétunia. Ces chercheurs ont introduit une copie supplémentaire d`un gène codant pour la chalcone synthase, une enzyme clé pour la pigmentation des fleurs pétunia normalement rose ou violettes. La surexpression du gène été supposée engendrer des fleurs sombres mais au lieu de cela ces chercheurs ont obtenu des fleurs moins pigmentées, entièrement ou partiellement blanches (Jorgensen *et al*, 1996). Quelques années après, d`autres travaux ont été menés par l`équipe de Guo et Kemphues sur le verre *Caenorhabditis elegans*. L`injection de l`ARN antisens au niveau du *C. elegans* engendre la létalité embryonnaire, un phénotype identique à celui observé en cas d`injection de l`ARN sens chez le témoin (Fire *et al*, 1998). Ce paradoxe rappelle les résultats obtenus chez le pétunia et résolu par Fire et Mello; travail pour lequel ils ont reçu le Prix Nobel en biologie en 2006. En effet, ces deux chercheurs avancent que l`introduction des ARN en sens ou anti-sens entraîne l`inhibition de la fonction de gène. Ils montrent aussi que l`introduction simultanée des ARN sens et anti-sens entraîne des résultats 10 fois plus efficaces que l`introduction de l`un ou de l` autre séparément. Ces travaux ont permis d`expliquer les résultats obtenus pour le pétunia. La couleur blanche de la fleur obtenue a été due à l`inhibition transcriptionnelle de l`activité de la chalcone synthase. Le processus de l`ARNi est

initié par l`enzyme Dicer qui est une endoribonucléase de la famille des ARNaseIII qui digère les molécules d`ARN double brin en petits fragments de 21-26 paires de bases appellés ARNsi (small interfering ARN). L`un des brins de chaque fragment digéré joue le rôle du brin guide et sera incorporé au niveau d`un complexe appellé RISC (RNA-induced silencing complex).

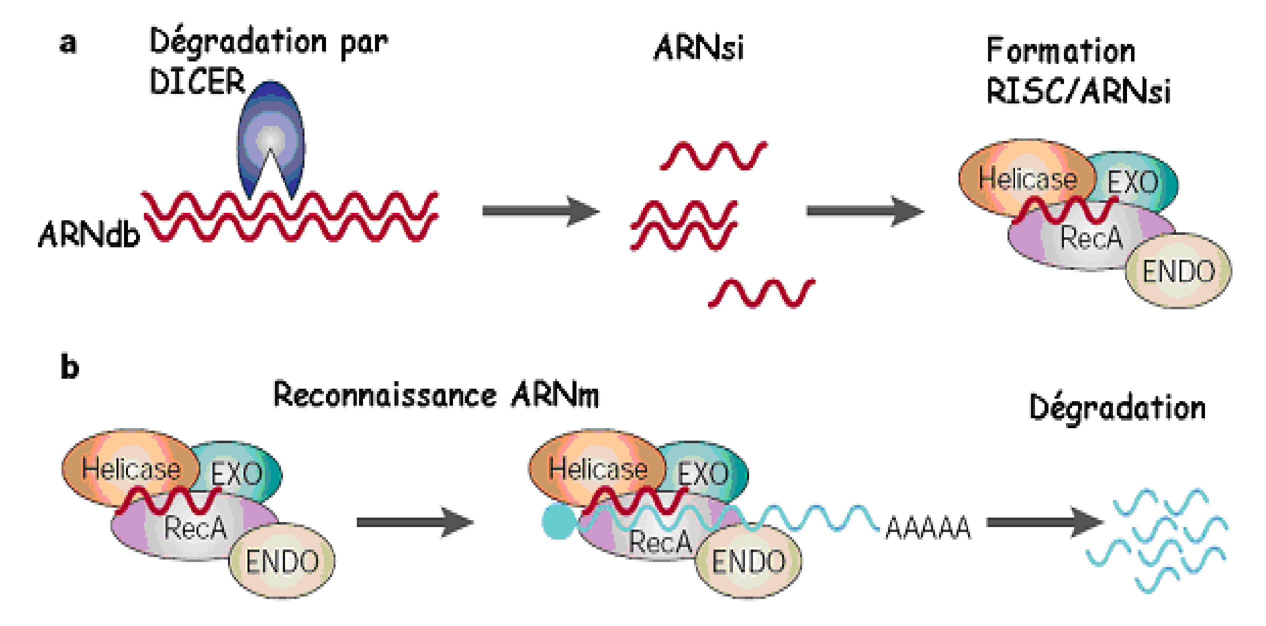


Figure I.12. Schéma montrant les deux étapes du mécanisme d`ARNi. (a). Une étape d`initiation de l`ARNi avec la dégradation des ARN doubles brins en fragments de 21-26 pb ou ARNsi et l`incorporation du brin guide dans le complexe RISC. (b). le complexe RISC va reconnaître et détruire les ARNm.

Le brin guide sera utilisé comme sonde pour détecter et s`apparier avec toute séquence complémentaire et assurer sa dégradation (Figure I.12).
Ainsi, la dégradation des ARN messagers (ARNm) en petits fragments ne pouvant plus se traduire en protéines entraîne le silençage des gènes. Pour ceci, l`ARNi est aussi appelé silençage post-transcriptionel.

Chez *Arabidopsis thaliana* existe plusieurs homologues de Dicer qui agissent quand la plante est exposée à plusieurs types de virus. Ce phénomène est reconnu pour être un système immunitaire adaptatif établi par la plante. En réponse, les virus affectant les plantes ont élaboré des mécanismes qui permettent de supprimer la réponse RNAi chez les cellules de plantes. Ceci inclut les protéines virales qui s`attachent aux courts fragments d`ARN double brin. Quelques génomes de plantes expriment aussi des ARNsi en réponse à une infection par des bactéries de types spécifiques.

Actuellement, l`ARNi est largement exploité en biologie pour étudier la fonction des gènes dans la culture de cellules *in vivo* pour plusieurs organismes modèles. Pour ce fait, l`ARN double brin est synthétisé à partir d`une séquence complémentaire au gène d`intérêt et introduit dans la cellule ou dans l`organisme. Cet ARN sera reconnu comme un matériel génétique exogène et va donc activer le processus d`ARNi. Ce moyen permet aux chercheurs de réduire l`expression des gènes cibles et d`étudier le rôle physiologique des produits du gène. On parle aussi du mécanisme de "Knock-down" par opposition au "Knock-out" qui permet d`inhiber entièrement l`expression du gène.

Les biologistes ont essayé l`altération de l`expression des gènes par ARNi chez plusieurs organismes avec différents niveaux de succès. Chez *C. elegans*, la drosophile et les plantes l`ARNi semble être un moyen spécifique et efficace pour la génétique reverse. Une autre classe d`organismes comprenant le poisson zèbre, xenopus et la souris semble se prêter pour l`ARNi mais avec des limitations (Hammond S. *et al*, 2001). Pour l`homme, l`ARNi peut être un moyen intéressant pour la lutte contre certains maladies.

III.2.3 Régulation de la transcription

Chez les animaux comme chez les plantes la régulation transcriptionelle joue un rôle important dans leur développement. Les gènes s`expriment de façon préférentielle dans le temps, à différents stades de développement ou en réponse au stimulus ainsi que dans l`espace pour un tissu donné. Cette expression est liée à des protéines particulières ou facteurs de transcription dont le rôle est de stimuler ou inhiber l`expression.

III.2.3.1 Les facteurs de transcription (FT): classification et importance

Au niveau des plantes, certains gènes s`expriment de manière constitutive alors que d`autres gènes répondent à des stimulations particulières. Ces deux schémas d`expression des gènes dépendent essentiellement de l`intéraction des facteurs de transcription avec des cis éléments et/ou autres facteurs de transcription nécessaires pour l`expression de gènes. Les facteurs de transcription sont définis comme étant des protéines intermédiaires entre la fixation de l`ARN polymérase et l`initiation de la transcription (Gregory *et al*, 2004; Shao *et al*, 2006). Les éléments cis régulateurs sont des séquences d`ADN reconnus au niveau du promoteur (séquence en amont de la séquence du gène). Cette interaction, facteur de transcription- élément cis régulateur, permet la régulation de l`activité cellulaire en assurant la stimulation ou l`inhibition de la régulation d`une cascade de gènes (Liu L. *et al*, 1999). Cette régulation est responsable d`importants changements morphologiques, physiologiques et/ou métaboliques (Gregory *et al*, 2004; Shao *et al*, 2006). Ainsi, l`altération de l`expression des facteurs de transcription est le résultat de grands changements chez la plante (Liu L. *et al*, 1999).

Plusieurs gènes de facteurs de transcription ainsi que leurs produits ont été bien caractérisés grâce aux techniques de manipulation des plantes et l`ingénieurie des gènes. La plupart des facteurs de transcription connus chez les plantes ont été précédemment identifiés chez les animaux. En effet, la détermination des domaines fonctionnels des facteurs de transcription chez les plantes se fait par comparaison de la séquence des acides aminés des ADNc en question avec leurs homologues chez les animaux.

Les études des domaines fonctionnels potentiels par les analyses fonctionnelles et de mutations montrent qu`un facteur de transcription typique est constitué de (i) une région de fixation de l`ADN, (ii) un site d`oligomerisation, (iii) un domaine de la régulation de la transcription et

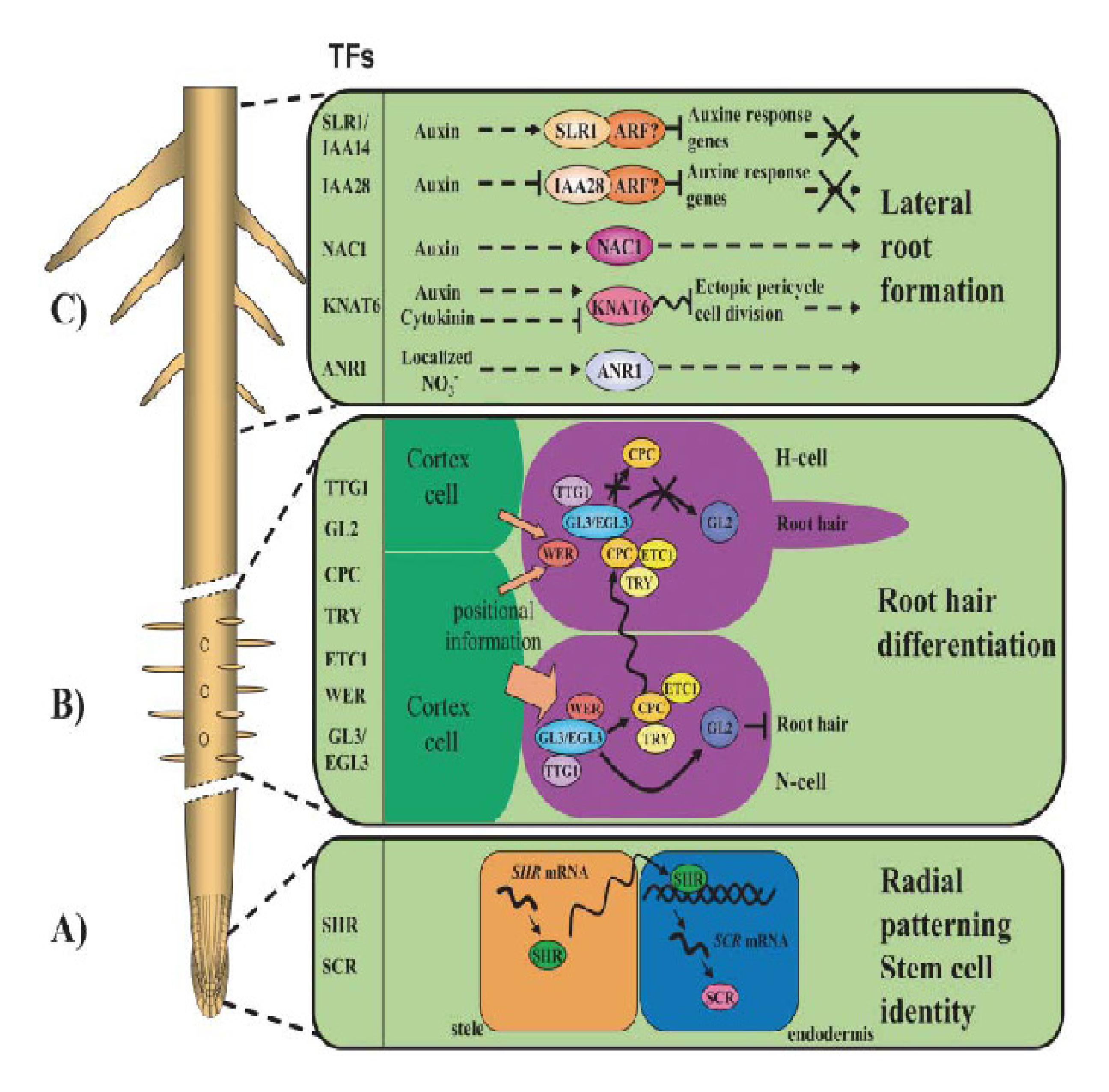


Figure I.13. Réseau de régulation au niveau racinaire impliquant quelques facteurs de transcription.

La régulation est représentée par des flèches pleines ou en pointilles (activation) ou barres (inhibition). Le mouvement des protéines est représenté par des flèches ondulées.

(Montiel et *al*, 2004)

(iV) un signal de localisation nucléaire (NLS= nuclear localisation signal) (Liu L. *et al*, 1999). Néanmoins, certains facteurs de transcription ne contiennent pas un domaine de la régulation de la transcription (Goff *et al*, 1992) ou une région spécifique de fixation d`ADN. On a aussi noté la présence d`autres domaines fonctionnels chez quelques protéines exemple du motif G-protein b-subunit-Like chez le COP1 (constitutive photomorphogenic 1) (Deng *et al*, 1992), et la protéine bZIP (basic zipper) (Sato *et al*, 1998). Ceci montre que de nouveaux domaines fonctionnels sont présents chez les facteurs de transcription des plantes (Liu L. *et al*, 1999). La classification des facteurs de transcription dépend de leurs caractéristiques structurales. Les domaines de fixation d`ADN constituent un ensemble de résidus d`acides aminés qui vont intéragir avec: (i) les bases d`ADN au niveau des éléments cis régulateurs et qui vont ainsi déterminer la spécificité de la protéine (ii) les ADN de manière non spécifique sous forme d`une interaction avec le phosphate ou désoxyribose.

On reconnaît ainsi plusieurs familles de facteurs de transcription: MADS-box, helix-loop-helix, MYB, finger, basic Leu-zipper ….etc. D`autres facteurs de transcription sont spécifiques aux plantes: APETALA2/EREBP (ethylene response element binding protein), WRKY (proteine caractérisée par la grande conservation de la séquence de l`acide aminé WRKYGQK), NAC (no apical meristem cup-shaped cotylédon), Dof (DNA binding with one finger), ARF (auxin response factor), et Aux/IAA (auxin/indole-3-acetic acid) proteins (Liu *et al.*, 1999) dont plusieurs s`expriment spécifiquement au niveau des racines (Tableau I.6 et Figure I.13).

Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans le développement racinaire normal à savoir la formation des racines latérales, la différenciation des poils racinaires et la structuration racinaire radiale (Figure I.13). On reconnait deux facteurs de transcription Scarecrow SCR et Short-root SHR qui sont impliqués dans la structuration radiale et l`activité méristématique au niveau de la pointe racinaire. SCR et SHR ont été largement étudiés chez *Arabidopsis thaliana* et sont liés à la formation et la spécification de l`endoderme (Di laurenzio, 1996; Sabatini S. *et al*, 2003; Jocelyn E. Malamy and Philip N. Benfey, 1997; Cui H. *et al*, 2007). Le gène SCR sera présenté plus en detail dans le paragraphe III.2.2.2a.

Tableau I.6. Liste de 18 Facteurs de transcription impliqués dans le développement racinaire.

Facteurs de transcription	Famille	Espèce	Fonction
MP	ARF	*Arabidopsis*	Etablissement du méristème racinaire
BDL	AUX/IAA	*Arabidopsis*	Etablissement du méristème racinaire
SHR	GRAS	*Arabidopsis*	Organisation racinaire radiale
SCR	GRAS	*Arabidopsis*	Organisation racinaire radiale, maintenance du méristème
QHB	HB	*Orysa sativa*	Maintenance du méristème racinaire
TTG1	WD40	*Arabidopsis*	Production du mucilage de graines et de pigments d`anthocyanine; la structuration des cellules de l`épiderme.
GL2	HB	*Arabidopsis*	la structuration des cellules de l`épiderme
CPC	MYB	*Arabidopsis*	la structuration des cellules de l`épiderme
TRY	MYB	*Arabidopsis*	la structuration des cellules de l`épiderme
ETC1	MYB	*Arabidopsis*	la structuration des cellules de l`épiderme
WER	MYB	*Arabidopsis*	la structuration des cellules de l`épiderme
GL3/EGL3	Bhlh	*Arabidopsis*	la structuration des cellules de l`épiderme
NAC1	NAC	*Arabidopsis*	Initiation des racines latérales
IAA28	AUX/IAA	*Arabidopsis*	Initiation des racines latérales
SLR1/IAA14	AUX/IAA	*Arabidopsis*	Initiation des racines latérales
KNAT6	KNOX	*Arabidopsis*	Initiation des racines latérales
ANR1	MADS	*Arabidopsis*	Initiation des racines latérales induites par du nitrate
AGL21	MADS	*Arabidopsis*	Initiation des racines latérales

(D’après Montiel et *al*, 2004)

III.2.3.2 Exemple d`une famille de facteurs de transcription (famille GRAS)

La famille GRAS est une importante famille de facteurs de transcription nommée selon les trois premiers gènes membres identifiés: Gibberellin-intensive (GAI), Repressor of ga1-3 (RGA) et Scarecrow (SCR) (Di Laurenzio *et al*. 1996; Peng *et al*. 1997; Silverstone *et al*. 1998). Aujourd`hui, on reconnaît chez *Arabidopsis thaliana* 33 Protéines de la famille GRAS dont seulement quelques unes qui ont été caractérisées (Lee et *al*, 2008).

Selon les études phylogénétiques précédentes (Pysh L. *et al*, 1999 et Bolle C., 2004) les protéines GRAS se divisent sept groupes: *DELLA*, *SCARECROW* (*SCR*), *LATERALE SUPPRESEURE* (*Ls*), *HAIRY MERISTEM* (*HAM*), PAT1, *SHORT ROOT* (*SHR*) et le groupe de *SCARECROW LIKE* (*SCRL9*). Les proteines de la famille GRAS sont connues pour leurs rôles très importants dans plusieurs processus à savoir la transduction, la maintenance du méristème et le développement (Bolle C., 2004).

Les protéines de cette famille sont typiquement composées de 400-770 acides aminés et partagent une similitude importante le long de la partie terminale. Cette séquence est caractérisée par cinq motifs distincts (Figure I.14) dans l`ordre suivant :

Leucine haptad repeat I (LHRI), le motif VHIID, Leucine heptad repeat II (LHRII), le motif PFYRE et le motif SAW.



Figure I.14. Schéma représentant les cinq domaines fonctionnels de la séquence conservée des produits de la famille GRAS.

Les motifs LHRI et LHRII ne sont pas fréquemment présents dans la structure. Le motif LHRI comprend deux unités séparées par un espaceur riche en proline et connu pour sa fonction d`interrompre la structure alpha hélice. La présence des motifs LHR dans les produits de la famille de GRAS suggère que la protéine fonctionne comme multimère (Hurst, 1994).

Le motif VHIID non conservé est reconnaissable par les résidus P-N-H-D-Q-L (Pro-Asn-His-Asp-Gln-Leu) et nommé selon les résidus les plus conservés V-H-I-I-D (Val-His-Ile-Ile-Asp).

Au niveau de la protéine SCR, la présence des motifs LHR I, LHR II et VHIID joue un rôle dans l`interaction protéine- protéine entre SCR et SHR.

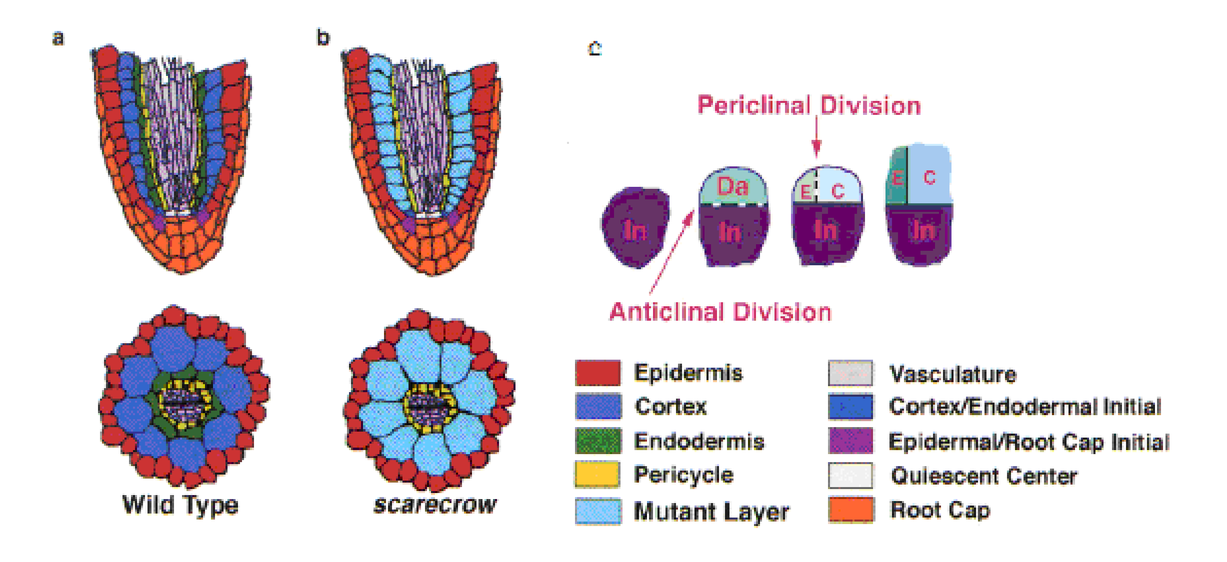


Figure I.15. (a) Représentation schématique de l`anatomie de la racine d`*Arabidopsis thaliana* en coupe longitudinale et transversale. (b) représentation schématique de l`anatomie de la racine du mutant SCR d`*Arabidopsis thaliana* en coupe longitudinale et transversale. (c) Les deux divisions asymétriques des cellules initiales donnant naissance au cortex/endoderme.

In, initial; Da, cellule fille; E, endoderme; C, cortex. (Di Laurenzio L, 1996; Malamy J. et Benfey P., 1997).

Le motif PFYRE moins conservé que les motifs VHIID et SAW est reconnaissable par les résidus P-F-Y-R-E (Pro-Phe-Tyr-Arg-Glu) et avec le résidu -P- qui est le plus conservé. Le motif SAW est reconnaissable par trois pairs de résidus très conservés : R-E (Arg-Glu), W-G (Trp-Gly) and W-W (Trp-Trp).

Les protéines GRAS décrites au niveau physiologique et moléculaire sont très importantes dans les mécanismes de régulation chez les plantes.

III.2.3.2a Le facteur de transcription *SCARECROW (SCR)*

Scarecrow est un facteur de transcription appartenant à la famille de GRAS et aussi le premier gène identifié dans ce groupe. Ce facteur de transcription est impliqué dans la régulation de la division asymétrique des cellules initiales au niveau de la racine.

Le gène SCR a été préalablement étudié chez *Arabidopsis thaliana* (Di laurenzio, 1996; Sabatini S. *et al*, 2003; J. E. Malamy and P. N. Benfey, 1997; Cui H. *et al*, 2007), *Orisa sativa* (Kamiya N. *et al*, 2003; Dilaurenzio *et al*, 1996), *Pisum sativum* (Sassa *et al*, 2001), *Zea mais* (Lim J. *et al*, 2000; Lim J. *et al*, 2005) et *Pinus sylvestris* (Laajanen K. *et al*, 2007).

Chez *A. thaliana* La mutation de type T-DNA au niveau du gène SCR entraîne l'absence de différenciation du cortex par rapport à l`endoderme.

Les cellules souches racinaires du (cortex et endoderme) connaissent deux types de divisions, une division anticlinale et une seconde division periclinale responsables de la formation des deux couches cortex/endoderme (Figure I.15).

La mutation au niveau du gène SCR s`accompagnée par la perte de la division periclinale ce qui engendre des racines avec une seule couche entre le pericycle et l'épiderme. Cette couche présente les caractéristiques du cortex et de l'endoderme d'où le rôle du SCR dans la spécification de l'endoderme. Le résultat de cette perte tissulaire se traduit par une tige agravitropique faute des cellules senseurs classiques. Le phénotype obtenu se résume en des plantes avec des racines courtes par rapport aux plantes sauvages. Le SCR est donc particulièrement impliqué dans la différentiation radiale des tissus au niveau de la tige et de la racine.

Dans le cas d'une mutation de type ARNi, on obtient aussi des plantes avec des racines courtes comme le cas des mutations T-DNA. Au niveau tissulaire on observe des racines avec plusieurs couches d'endoderme entre le pericycle et l'épiderme on parle de "supernumerary".
De récents travaux (Cui *et al*, 2007) montrent que le gène SCR n`est pas autorégulé et qu`il est par contre sous le control d`un autre facteur de transcription, SHR. La mutation au niveau du SHR génère un phénotype similaire à celui des mutants SCR d'où le nom short root ou racines courtes. Le gène SHR s`exprime au niveau du tissu vasculaire et à partir duquel la protéine migre vers l`endoderme où elle sera bloquée par SCR au niveau du noyau.
Le complexe protéique SCR-SHR va se fixer sur le promoteur de SCR pour stimuler l'expression de SCR. Les deux protéines SCR et SHR vont former un complexe protéine-protéine. Ce complexe SCR-SHR se fixe aussi sur d'autres promoteurs comme le *MAGPIE* (*MGP*), *SCR-Like3* (*SCRL3*), *NUTCRACKER* (*NUC*), *RECEPTOR-LIKE KINASE* (*RLK*).

Chez toutes les espèces étudiées jusqu`à aujourd`hui, SCR s`exprime au niveau de la couche endodermique et du centre quiescent. La présence de l`endoderme sous forme d`une seule couche semble être un mécanisme évolutif conservé et en relation avec le gène SCR (Cui *et al*, 2007). La caractéristique du SCR en tant que marqueur des cellules souches a été utilisée dans plusieurs travaux. Chez le mais, une étude a porté sur l'excision partielle et totale de la pointe de la racine et l'analyse de la régénération de la pointe racinaire et de la structuration radiale. SCR a été utilisé comme marqueur dans l'étude de la structuration radiale et la régénération du méristème apical racinaire MAR après excision partielle ou totale de la pointe de la racine. L'expression du SCR a facilité la définition des différentes étapes durant le processus de régénération.
La dynamique et la haute expression du SCR suggère que ce gène joue un rôle important dans le maintient et l'établissement du profil radiale correct du MAR (Lim J. *et al*, 2005).
Chez le Pin sylvestre; SCR joue aussi un rôle important dans l'établissement du profil radiale au niveau des racines courtes dichotomiques nouvellement formées (Laajanen K. *et al*, 2007).

IV. Le lupin blanc et les stress abiotiques

L`un des soucis de l`agriculteur aujourd`hui est de trouver une solution aux cultures des plantes limitées par des facteurs abiotiques tels que le déficit hydrique, l`excès d`eau, la toxicité ou la

présence de sels dans le sol. Une étape clé pour résoudre le problème des cultures dans le monde est la compréhension des mécanismes de tolérance et d`adaptation des plantes dans les différentes conditions de stress. En effet, les populations natives d`une région quelconque présentent des mécanismes d`adaptation physiologiques et moléculaires aux stress rencontrés. Les premier travaux sur l`adaptation des plantes au stress environnemental ont été initiés par le Professeur Tony Bradshaw FRS en 1960 et depuis plusieurs travaux se sont succédés.

IV.1 Stress abiotiques

Les facteurs abiotiques sont des facteurs écologiques ou facteurs physico-chimiques influençant une biocénose donnée. On peut classer les facteurs abiotiques de différente manière, on représente ici le classement le plus simple subdivisant ces facteurs en quatre catégories:
(i) Les facteurs d`ordre climatique avec comme éléments l`eau, la lumière, la température et l`air.
- L`eau est un facteur très important, en tant qu`élément essentiel pour certains organismes vivants et écosystèmes. Ce paramètre sera discuté plus en détail dans cette partie.
- La lumière est un élément essentiel pour les organismes photosynthétiques. Néanmoins, la photopériode (qualité et quantité de la lumière) peut être un facteur limitant de la croissance et du développement de certains organismes vivants.
- La température peut aussi être un facteur limitant de la croissance des être vivants. L`étude des mécanismes d`adaptations des organismes aux températures extrêmes est aussi très intéressante.
- L`air étant un élément important dans les mécanismes de dissémination de pollen par exemple, il peut aussi être limitant selon l`intensité, la fréquence et la direction du vent.
(ii) Les facteurs d`ordre édaphique sont liés à la structure (granulométrie) et la composition du sol en humus et en éléments minéraux en particulier les phosphates, calcium, fer, nitrate….etc.
L`importance des phosphates et le stress phosphorique sera traitée en détail dans la partie IV-2.
(iii) D`autres facteurs liés à la topographie (altitude, pente, gravite…etc.) sont aussi importants.
Un des stress très limitant pour les plantes étant le stress hydrique du fait que la sécheresse est l`un des problèmes majeurs de l`agriculture dans le monde. En effet, quatre dixièmes des terrains agricoles dans le mondes se situent dans des régions arides à semi-arides. D`autres régions agricoles reçoivent des quantités d`eau très faibles nécessitant une irrigation continue pour maintenir les cultures. On se trouve donc dans la nécessité de développer des cultures avec une faible exigence en eau et un rendement acceptable.

Les plantes modèles pour l`adaptation au stress hydrique ou encore plantes reviviscentes sont des plantes capables de survivre dans les conditions de sécheresse extrême. Ces plantes sont capables de développer des mécanismes d`adaptations physiologiques et moléculaires.

IV.2 Le lupins blanc: plante modèle pour l`étude de l`adaptation au stress phosphorique

Le phosphore est l`un des six macronutriments essentiels pour les plantes à savoir; l`azote (N), le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg) et le soufre (S). Le phosphore joue un rôle important dans plusieurs processus tels que la photosynthèse, la régulation des enzymes, la synthèse des acides nucléiques et membranes et aussi dans le métabolisme de l`énergie Raghothama, 1999). Néanmoins, le phosphore demeure un élément inaccessible et indisponible de part sa faible concentration dans le sol qui est de l`ordre de 2 a 10 µM (Raghothama, 1999) et

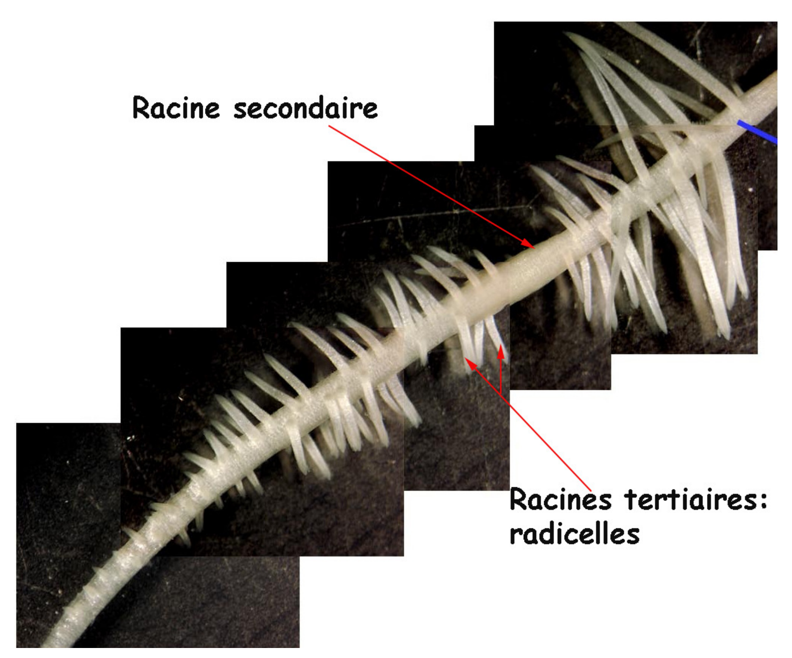


Figure I.16. Racines proteoïdes de *Lupinus albus* cultivé en carence Phosphorique (-P)

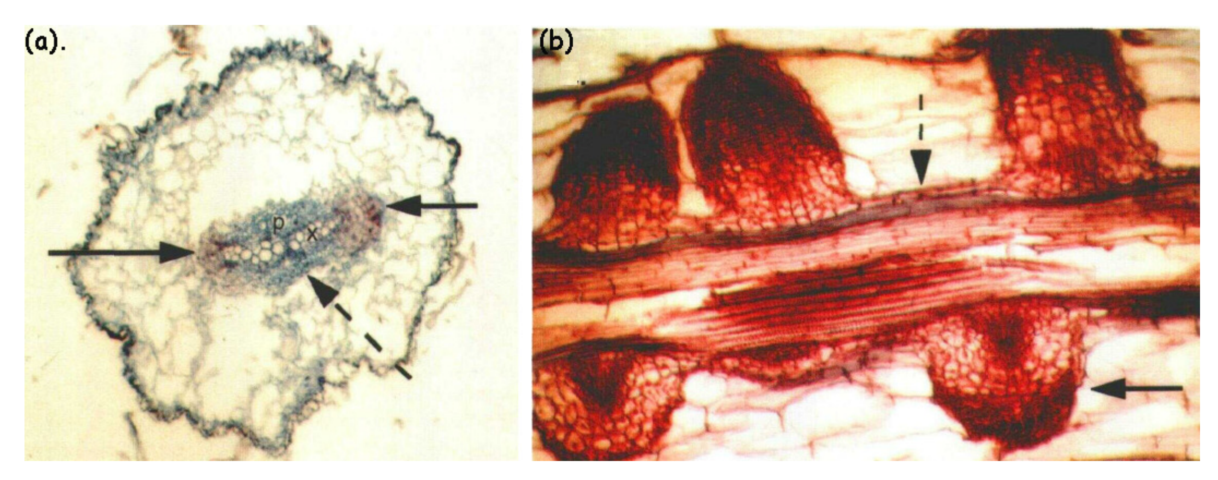


Figure I.17. Racines proteoïdes récoltées de plantes cultivées en condition de carence phosphorique (-P) (a) coupe transversale d`une racine proteoïde sectionnée 1 cm de la pointe apicale. (b) coupe longitudinale d`une racine proteoïde sectionnée 2 cm de la pointe apicale.

Les sections ont été colorées avec de la safranine et du vert. (Fast green). Flèches solides: Développement des méristèmes des racines tertiaires ; Flèches en pointilles: pericycle; X: Xylème; P: Phloème. Le diamètre de la racine est de 1 mm. Le grossissement est de 100 X. (Johnson J. *et al*, 1996)

aussi du fait qu`en conditions acides le phosphore forme des complexes insolubles avec des cations en particulier l`aluminium (Al) et le fer (Fe). En conséquence, 30 à 40 % du rendement des récoltes des terrains cultivés du monde est limitée par la disponibilité du phosphore (Runge-Metzger, 1995). Pour ceci, l`apport d'engrais phosphaté est nécessaire pour les cultures. Néanmoins, les sources naturelles d`engrais de phosphate sont non renouvelables (exemple des rochets de phosphate) et seront épuisées dans les prochains 60-90 ans (Runge-Metzger, 1995). Aussi, l`utilisation excessive des engrais peut polluer les cours d`eau locales et entraîner le processus d`eutrophisation (Withers *et al*., 2001). Pour remédier à ce genre de situations une meilleure gestion des engrais en phosphate est nécessaire ainsi que le développement de cultures capables d`acquérir ou d'utiliser le phosphore plus efficacement.

Certaines plantes développent des mécanismes d`adaptations permettant l`assimilation du phosphore du sol (Hammond J. *et al*, 2004). C'est le cas du lupin blanc qui présente une tolérance particulière au stress phosphorique (Dinkelaker *et al*., 1989; Gardner *et al*., 1982). En effet, cette plante s`adapte à la carence phosphorique avec une modification morphologique du système racinaire qui s`accompagne par une adaptation biochimique consistant en la sécrétion d`acides organiques et l`expression d`un ensemble de gènes Ces modifications accroîssent l`acquisition du phosphate par le lupin blanc (Liu *et al*., 2001; Neumann *et al*., 1999; Penaloza *et al*., 2002; Uhde-Stone *et al*., 2003). Grâce à sa tolérance extrême au stress phosphorique le lupin blanc est devenu une plante modèle pour l`étude de l`adaptation des plantes à la carence phosphorique.

IV.2.1 Adaptation morphologique: Racines proteoïdes

Le lupin blanc et la plupart des membres de la famille des *Proteaceae* forment des racines secondaires/tertiaires avec une structure particulière appelée: proteoïdes en réponse à certains stress (Phosphorique, Ferrique et d`azote) (Purnell 1960; Dinkelaker, Hengeler & Marschner 1995; Neumann & Martinoia 2002; Lamont 2003; Shane & Lambers 2005).

Les racines proteoïdes peuvent être définies comme étant des racines secondaires avec 10 méristèmes ou plus par centimètre ou bien des racines tertiaires (Figure I.16). Les racines proteoïdes sont caractérisées par un développement limité. Ces racines prennent naissance du pericycle au niveau de chaque pôle opposé au xylème (Figure I.17) en comparaison avec les racines normales qui émergent aussi du pericycle et des pôles opposés du xylème mais de façon non ponctuelle. On observe occasionnellement les méristèmes des racines secondaires 5 jours

après émergence (JAE). Les racines tertiaires ou radicelles se développent rapidement dans le cortex et émergent à travers l`épiderme 8 JAE (Figure I.18).

Dans le champ, les racines proteoïdes de *Banksia prionotes* forment une touffe dense dans la couche organique au niveau de la surface du sol sableux. Ces racines sont capables d`assimiler le Phosphore, l`azote et les micronutriments à des quantités plus importantes que les racines non proteoïdes profondes (Jeschke and Pate, 1995).

IV.2.2 Adaptation Biochimique

Les racines proteoïdes acidifient fortement la rhizosphère adjacente en secrétant une grande quantité d`acides organiques en particulier les citrates et les malates. Ceci, permet à la plante d`extraire le phosphate inorganique d`un volume restreint du sol. Les protons solubilisent le phosphore dans les sols calcaires. Le lupin blanc et la plupart des *Proteaceae* se développent sur des sols acides. Les dicarboxylates et tricarboxylates agissent comme des échangeurs d`anions pour le phosphate permettant de le libérer des complexes Fe-P, Al-P ou Ca-P. La sécrétion de protons et d`acides organiques permettent aux plantes qui forment des racines proteoïdes de survivre sur des sols pauvres en phosphore. La quantité des citrates et malates secrétés diffère d`un stade à un autre du développement des racines proteoïdes. Les jeunes proteoïdes en développement secrètent beaucoup de malates et une faible quantité de citrate alors que les racines proteoïdes non mâtures secrètent une quantité similaire de citrates et malates. Les proteoïdes matures secrètent de grandes quantités de carboxylates particulièrement des citrates et acidifient la rhizosphère. La solubilisation, l`extraction et l`assimilation du phosphore se fait au stade mature des racines proteoïdes. Le lupin blanc développe une stratégie complexe pour protéger les acides organiques secrétés contre la dégradation microbienne. On remarque une augmentation de l`excrétion des isoflavonoides au niveau des racines proteoïdes juvéniles et immatures. Ceci entraine une diminution de l`abondance des bactéries totales dans la zone entourant les racines proteoïdes matures. On relève aussi, une lutte contre les champignons avec l`augmentation de l`activité glucanase et chitinase à un stade précédant l`excrétion des citrates (Weisskopf L. *et al*, 2005).

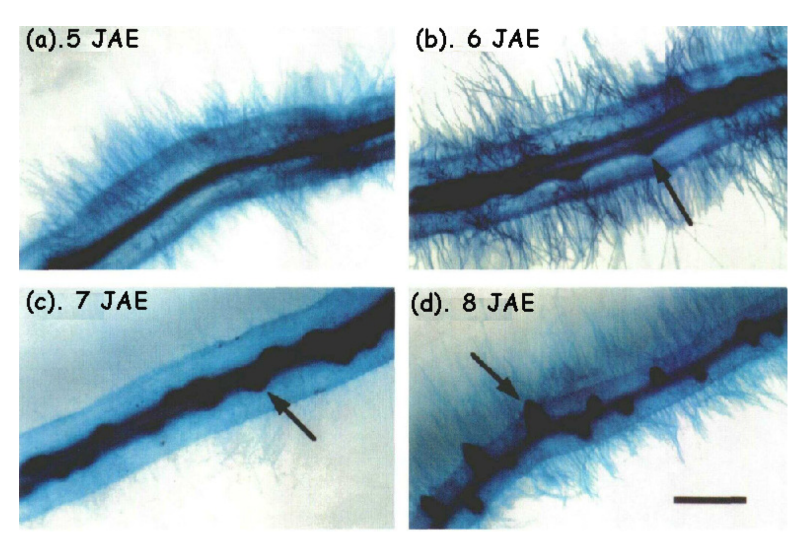


Figure I.18: Racines secondaires latérales collectées 2cm de la zone de transition des racines du lupin blanc cultivé en condition de carence phosphorique (-P).

Les flèches montrent les méristèmes des racines secondaires à (a) 5 JAE, (b) 6 JAE, (c) 7 JAE et (d) 8 JAE. Les racines sont colorées au bleu de méthylène. Barre d`unités: 1 mm. Grossissement 30 X.

IV.2.3 Adaptation génétique

Les racines proteoïdes du lupin blanc cultivé sous carence phosphorique (-P) montrent un système de régulation de l`expression de certains gènes. Ceci influence, l`acquisition du phosphate inorganique Pi et du carbone, le métabolisme secondaire ainsi que les processus de développement. On note aussi la stimulation de l`expression des gènes liés à la glycolyse (Uhde-stone *et al*, 2003). Le gène LaMATE est hautement exprimé au niveau des proteoïdes du lupin blanc cultivé sous différents types de stress à savoir en manque de phosphore (–P), de fer (-Fe), d'azote (-N), de manganèse (-MN) et en excès d'aluminium (+Al) (Uhde-stone *et al*, 2005). Actuellement on utilise le gène LaMATE comme marqueur génétique des racines proteoïdes développées en absence de phosphore.

Plusieurs travaux ont montré que les racines proteoïdes développées en carence phosphorique synthétisent dans la rhizosphère un ensemble de protéines impliquées dans l`acquisition du Pi du sol. On note l`acide phosphatase LaAP (Miller S. *et al*, 2001), les transporteurs de phosphate, les phosphoenolpyruvate carboxylases PEP (Goldstein, 1992; Malboobi and Lefebvre, 1995; Johnson *et al*. 1996; Neumann *et al*., 1999) et malate dehydrogenase (Uhde-stone *et al*, 2003).

CHAPITRE II:
Le lupin au Maroc: Structuration de la diversité

INTRODUCTION

L'étude de la diversité du genre *Lupinus* a été abordée dans quelques travaux antérieures (Ainouche *et al*, 1999; 2000; 2003; 2004 et Talhinhas, 2003). Néanmoins, la diversité génétique du lupin marocain n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude. Le présent travail constitue la première approche de la variabilité génétique des populations du lupin marocain.
Pour réaliser cette étude, nous avons choisi trois marqueurs moléculaires.

Les marqueurs RAPD (Williams *et al*, 1990) constituent l'un des premiers marqueurs moléculaires utilisés et qui ont ainsi largement servi dans les études de la diversité des plantes.

Les marqueurs AFLP (Vos *et al*, 1995) ont été choisis dans l'étude de la diversité inter-spécifique. Le protocole AFLP de base a été adopté après une série de modifications.

Les marqueurs ISSR (Zietkiewicz *et al*., 1994) ont constitué des marqueurs de choix pour les avantages qu'ils présentent. Aussi, ces marqueurs ont été utilisés dans une étude sur la caractérisation du lupin (Talhinhas, 2003). Ces marqueurs ISSR ont permis d'avoir une bonne séparation des espèces de lupin étudiées ainsi que de révéler un niveau élevé de polymorphisme.
Nous avons donc adopté ce protocole ISSR en effectuant quelques mises au point pour assurer une bonne reproductibilité des résultats.
Ces marqueurs ISSR ont servit à l'étude de la variabilité inter et intra spécifique du lupin.

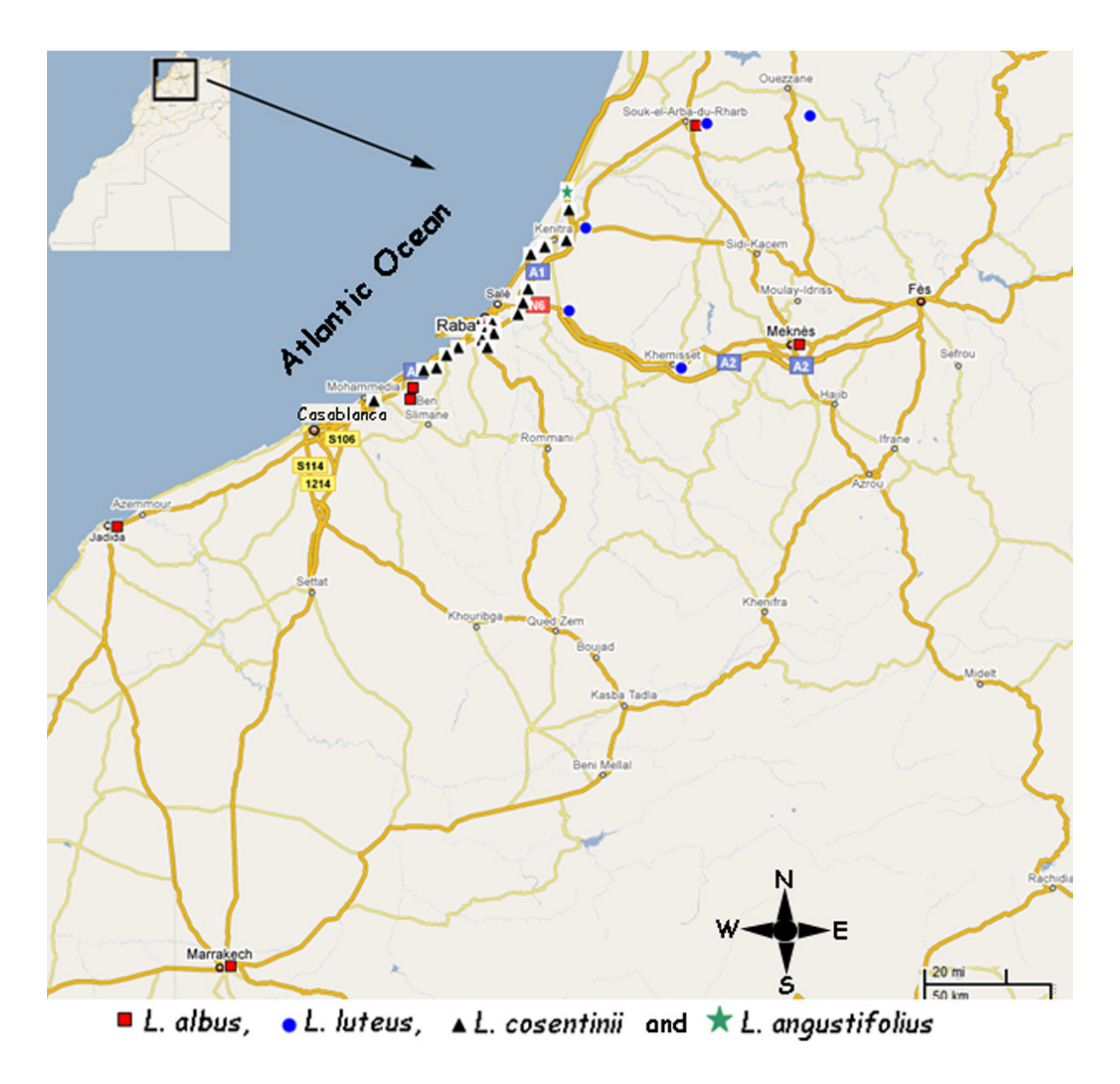


Figure II.1. Sites de collecte des accessions marocaine de lupin utilisées dans cette étude

II- 1. Matériel et méthodes

II- 1-1. Présentation de la collection Marocaine du lupin utilisée

Les échantillons du lupin utilisés dans cette étude comportent 44 accessions (sites de collecte) avec quatre espèces de Lupin (Tableau II.1 et Figure II.1). *L. albus* représentée par 10 accessions, *L. angustifolius* par une accession, *L. cosentinii* par 24 accessions et *L. luteus* représentée par 9 accessions.

L'échantillonnage de cette collection a été réalisé entre 1998 et 1999 par l'institut National de la recherche Agronomique sous la direction de Mme Imane thami alami. Les graines de certaines accessions ont été achetées comme cité dans le tableau II.1. L'échantillonnage des plantes sauvage a porté sur des gousses matures.

Tableau II.1 : Liste des différents échantillons de lupin du Maroc étudiées avec codes et sites de collecte

Espèce	Codes échantillon		Site de collecte
	INRA	Utilisés	
Lupinus albus	*024*	*Alb01*	Souk Larbâa *
	028a	*Alb02*	6 Km après Bouznika vers Benslimane champ 1
	028b	*Alb03*	6 Km après Bouznika vers Benslimane champ 2
	029	*Alb04*	1 Km avant Benslimane
	030	*Alb05*	Douar Beni Moussa à Ain Dakhla
	031	*Alb06*	Meknès
	032	*Alb07*	Meknès
	033	*Alb08*	El Jadida
	034a	*Alb09*	Marrakech *
	034b	*Alb10*	Marrakech *
Lupinus angustifolius	*016*	*Ang1*	20 Km après Kenitra vers Larache
Lupinus luteus	*025*	*Lut1*	Souk Larbâa *
	026	*Lut2*	15 Km avant Kénitra sur la route de Souk Larbâa vers Kénitra
	037	*Lut3*	Touazite (Kasmiine) sur la route qui croise S232 5 Km de Sidi Yahya vers Tiflet

* Graines achetées des régions citées.

Tableau II.1 (Suite): Liste des différentes accessions de lupin du Maroc étudiées avec code et sites de collecte.

Espèce	**Codes accessions**		**Site de collecte**
	INRA	**Utilisés**	
Lupinus luteus	*039*	*Lut05*	Salé. Douar Zriwil
	040	*Lut06*	Région de khenifra. sur la route de Tiflet vers Sidi Abderrazek à Sidi Ammar
	041a	*Lut07*	Khemisset. A Sidi Allal M'ssedar, Sebt Aït Abou champ 1
	041b	*Lut08*	Khemisset. A Sidi Allal M'ssedar, Sebt Aït Abou champ 2
	042	*Lut09*	Ouazzane. sur la route d'Ouazzane vers Aïn Dfali
Lupinus cosentinii	*001*	*Cos01*	Rabat, Réserve naturelle, ceinture verte
	002	*Cos02*	Rabat, Hay Riad, sur la grande route avant le parc zoologique
	003	*Cos03*	Rabat, à l'intérieur de Hay Riad
	004	*Cos04*	Sur la route Rabat vers Sidi Yahya Zaïr
	005	*Cos05*	De Rabat sur P2 vers Kénitra au bord de la route
	006	*Cos06*	La sortie de Kenitra vers Rabat
	007	*Cos07*	Sur Autoroute Rabat-Kénitra
	008	*Cos08*	Sidi Ayach (Kenitra) champ 1
	009	*Cos09*	Sidi Ayach (Kenitra) champ 2
	010	*Cos10*	Sidi Ayach (Kenitra) champ 3
	011	*Cos11*	15 Km avant Kenitra sur la route de Souk Larbâa vers Kenitra
	012	*Cos12*	Oued Yquem, champ 1
	013	*Cos13*	Oued Yquem, champ 2
	014	*Cos14*	L'hippodrome du prince héritier Sidi Mohamed
	017	*Cos15*	10 km de Kenitra vers Larach
	018	*Cos16*	Témara ceinture verte
	019	*Cos17*	Hay Menzah ceinture verte champ 1
	020	*Cos18*	Hay Menzah ceinture verte champ 2
	021	*Cos19*	Hay Menzah ceinture verte champ 3
	022	*Cos20*	Début Autoroute Rabat vers casa
	027	*Cos21*	10 km de Rabat vers Casablanca sur Auto route
	035	*Cos22*	30 km de Rabat vers Casablanca sur Auto route
	036	*Cos23*	Mohammedia

II-1-2 Protocole d`extraction des ADN du lupin

Afin de trouver un protocole d`extraction d`ADN convenable pour le lupin, nous avons consulté plusieurs protocoles d'ADN de plantes. Deux principaux protocoles d'extraction ont été retenus du fait qu'ils répondaient parfaitement à nos besoins, à savoir la faisabilité au laboratoire et une technicité raisonnable.

II-1-2-1 Extraction de l'ADN total du lupin selon le protocole de BERNATSKY et TANKSLEY (1986)

Le premier protocole choisi est celui développé par BERNATSKY et TANKSLEY en 1986 et qui a été largement utilisé chez de nombreuses familles de plantes (Graminées, Orchidées, Conifères, Fougères et Légumineuses). Ce protocole est convenable pour l`extraction des ADN à partir de tissus frais ou séchés. Il est caractérisé essentiellement par l'utilisation du Céthyl Triméthyl Ammonium Bromide CTAB.

Le protocole de BERNATSKY et TANKSLEY préconise l'extraction d'ADN à partir de 200 mg de feuilles fraiches finement découpées. Le matériel végétal est broyé à l'aide de mortier et pilier pré-refroidis et dans 700 µl de tampon d'extraction (0,14 M de Sorbitol; 0,22 M Tris-pH (8.0); 0,22 M EDTA; 1,8 M NaCl; 15 g/l de CTAB et 1% de β-mércaptoéthanol).

Après homogénéisation du broyat on ajoute 300 µl de tampon d'extraction et on broie à nouveau pendant 5 mn et on transfert l'homogénat dans un nouveau tube eppendorff. Le mélange est incubé dans la glace pendant 5 mn avant d'ajouter 800µl de phénol/chloroforme/alcool isoamilique (25/24/1). On fait agiter les tubes pendant 20 mn à température ambiante. Après une étape de centrifugation à 10000g pendant 3 à 5 mn on récupère le surnageant et on le maintient dans la glace. On ajoute au surnageant récupéré 500 µl d'isopropanol pré-refroidi à – 20°C et on mélange par inversions des tubes. On incube le mélange à -20°C pendant 30 mn. Ensuite, on centrifuge à 12000 g pendant 10 mn et le culot récupéré est lavé 2 fois avec 100 µl d'éthanol (70%) pré refroidi. Le culot est ensuite bien séché et suspendu dans 50 µl de TE (Tris – EDTA).

Cet ADN récupéré est quantifié par spectrophotométrie à 260 nm et 280 nm.

Pour vérifier la qualité de l'ADN extrait nous avons fait migrer par électrophorèse différents volumes de cet ADN sur gel d'Agarose (0,8%). Après révélation du gel, aucune bande n'a été

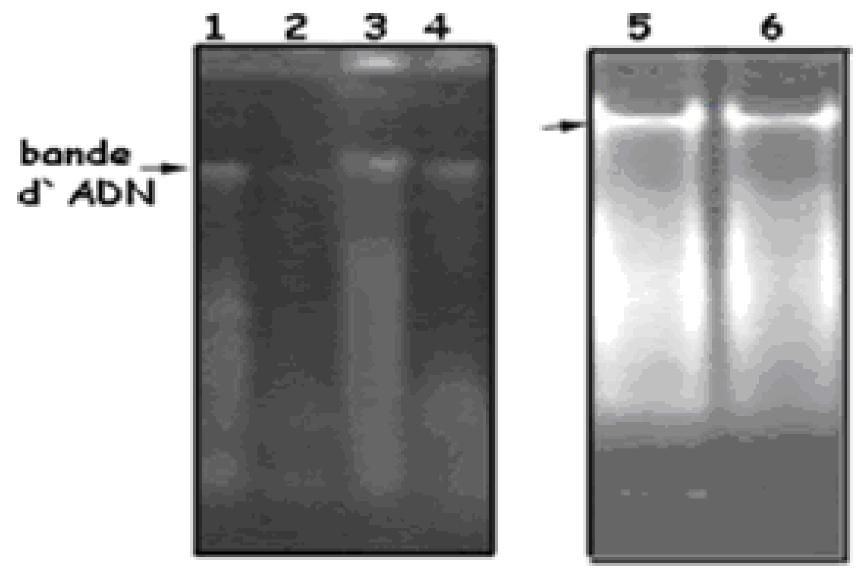


Figure II.2: Gel d`agarose montrant l`ADN extrait selon le protocole de BERNATSKY et TANKSLEY (1, 2, 3 et 4) et le protocole de B. OUENZAR (5 et 6).

détectée. Aussi, la quantification de l'ADN par spectrophotométrie à 260 nm n'a pas donné de signal. Suite à ces résultats, nous avons du apporter quelques modifications au protocole d'extraction utilisé.

II-1-2-2 Extraction de l'ADN total du lupin selon le protocole modifié de BERNATSKY et TANKSLEY (1986)

La modification du protocole d'extraction d'ADN de BERNATSKY et TANKSLEY a porté essentiellement sur la concentration des différents constituants du tampon d'extraction. Deux tampons d'extraction ont été essayés, le tampon 1 avec 0,14 M sorbitol; 0,22 M Tris (pH 8.0); 0,22 M EDTA; 15 g/l CTAB; 1% de β-mercaptoéthanol et avec comme modification l'utilisation de 0,22 M de NaCl et de 10 g/l de N-lauryl sarcosine.
Le tampon 2 comporte 0,15 M Tris (pH 8.0); 0,015 M EDTA; 1 M NaCl; 15 g/l de CTAB et 1% de β-mercaptoéthanol.
Les concentrations ont été choisies en se référant à d'autres protocoles d'extraction. L'extraction de l'ADN a été réalisée selon les mêmes étapes et conditions du protocole de base détaillé au paragraphe II.1.2.1.
La vérification de la qualité et quantité de l'ADN extrait par électrophorèse et spectrophotométrie a révélé un ADN d'une qualité (Figure II.2) et quantité très faibles.
Nous avons ainsi abandonné ce protocole sans pour autant tenter d'effectuer d'autres modifications.

II-1-2-3 Extraction de l'ADN total du lupin selon le protocole brute de B. OUENZAR et al. (1998)

Le deuxième protocole d'extraction d'ADN qui nous a semblé assez intéressant est un protocole développé par Ouenzzar B. en 1998 pour le palmier dattier. Ce protocole est basé sur l'extraction de l'ADN à partir de 200 mg de feuilles fraiches bien découpées. Le matériel végétal est bien broyé dans 700 µl de tampon d'extraction (50 mM Tris (pH 8.0), 3 mM EDTA (pH 8.0), 300 mM Mannitol, 0,1 % d'albumine de serum bovin, 1 % de polyéthylene glycol et 0,028 % de β-mercaptoéthanol). On rajoute 300 µl du tampon d'extraction et on broie à nouveau pendant 5 mn. On transfert l'homogénat dans un tube eppendorff de 2 ml contenant 800 µl de phénol-chloroforme, 100 µl de SDS 20% et 80 µl d'acétate de sodium 3M. On homogénéise le mélange par de simples inversions pendant 5 mn et à température ambiante. Ensuite, on incube le tout à

60°C pendant 5 mn en assurant des agitations intermédiaires. On laisse les tubes refroidir dans la glace avant de centrifuger à 5600 g pendant 10 mn à température ambiante. Au surnageant récupéré on ajoute le même volume d'isopropanol pré refroidi à -20°C et on maintient les tubes dans la glace pendant 2 heures. Un culot est récupéré après une centrifugation à 5600g pendant 10 mn. le culot est lavé avec de l'éthanol 70%, séché et suspendu dans 50 µl de TE. La vérification de la qualité de l'ADN par électrophorèse révèle une bande intense et bien claire significative d'un ADN de bonne qualité (Figure II.2). La qualité de l'ADN a été confirmée par mesure de la densité optique à 260 nm et à 280 nm. Néanmoins, la quantité d'ADN obtenue nous a semblé insuffisante pour réaliser l'ensemble des expériences de PCR programmées.

II-1-2-4 Protocole amélioré de B. OUENZAR (1998)

Le protocole de B. Ouenzar (1998) a été maintenu pour l'extraction de l'ADN du lupin avec deux modifications principales afin de le rendre plus pratique. Nous avons augmenté la quantité du matériel végétal initial utilisée afin d'avoir suffisament d'ADN:

- 1g de feuilles fraiches de lupin a été utilisé au lieu de 200 mg. Aussi, l'ensemble des volumes des tampons utilisés dans l'extraction ont été ajustés (multipliés par 5).
- L'étape d'incubation à 60°C du matériel végétal broyé avec le SDS et l'acétate de sodium a été performé sans phénol/chloroforme. Par mesure de sécurité le phénol/chloroforme a été ajouté au mélange après l'étape d'incubation.

II-1-3 Les marqueurs RAPD: Optimisation du protocole d`amplification RAPD-PCR

Les marqueurs RAPD ont été choisis dans un premier temps afin d`étudier la diversité génétique chez le lupin du Maroc. Nous avons commencé par optimiser le protocole d'amplification pour avoir un résultat interprétable et reproductible. Nous avons ainsi testé différentes concentrations des composants du mélange réactionnel de la PCR ainsi que du programme d'amplification. Les ADN de deux espèces de lupin ont été utilisés dans ces tests d'optimisation *L. luteus* et *L. cosentinii*. *L. luteus* étant une espèce cultivée dont les graines proviennent de la région de Kénitra. *L. cosentinii* est une espèce sauvage que l'on a récoltée dans la région de Rabat- Ryad.

II-1-3-1- Optimisation du mélange réactionnel de l`amplification RAPD-PCR

Le protocole de Williams *et al* (1990) a été utilisé comme protocole de base pour l'amplification RAPD et à partir duquel nous avons commencé la série d'optimisation des composants du mélange réactionnel.

1- La concentration de l'ADN étant un paramètre très important de la PCR. Nous avons testé quatre concentrations différentes 30 ng, 60 ng, 90 ng et 120 ng.
2- La concentration du $MgCl_2$ est très critique dans tout mélange réactionnel. Nous avons ainsi essayé quatre concentrations différentes 1,5, 2,0, 2,5 et 3,0 mM.
3- Les dNTP ont été aussi un facteur à optimiser. Nous avons essayé les concentrations de 100, 150, 200 et 250 µM.
4- La concentration des amorces a été aussi un facteur influençant le profil de l'amplification. Quatre concentrations ont été testées 0,1, 0,15, 0,2 et 0,25 mM

Deux facteurs clé du programme d'amplification ont été optimisés: la température d'amorcage que nous avons fait varier entre 30ºC, 32ºC, 35ºC et 40ºC; et le nombre de cycles d'amplification essayés: 40, 50, 60 et 65 cycles.

II-1-3-2- Protocole d`amplification de l'ADN par la RAPD-PCR.

Après la série d`optimisation du protocole d`amplification par RAPD nous avons opté pour le mélange réactionnel et le programme d`amplification qui nous a permis d'avoir le meilleur profil d'amplification.

La RAPD- PCR a été optimisée dans 25 µl de volume final avec 10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 50 mM KCl; 2,5 mM $MgCl_2$; 200 µM de: dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 0,2 mM d` amorces; 2,5 mM de Taq polymerase (promega) et 30 ng/µl d`ADN. L`amplification a été réalisée dans un thermocyleur AMPLITRON-RII selon le programme d`amplification suivant:

Une étape de dénaturation de l'ADN à 90°C pendant 3 mn suivie de 60 cycles d'amplifications comportant chacun une dénaturation à 94°C pendant 1 mn, une étape d`amorcage à 35°C pendant 1 mn et une étape d`élongation à 72 °C pendant 2 mn. Le programme est ensuite bouclé par une étape finale d`élongation à 72 °C pendant 15 mn.

Ces protocoles ont été utilisés pour amplifier les ADN du *L. luteus* et *L. cosentinii* moyennant 97 amorces RAPD.

Les produits de l`amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1 %) et dans un tampon de migration Tris Borate EDTA (TBE). Le gel est soumis à un courant de 50 V pendant 5 heures. Les produits PCR sont par la suite visualisés sous ultras- violets après coloration au bromure d'ethidium (10 mg/ml).

II-1-4 Les marqueurs ISSR

Les marqueurs ISSR ont été des marqueurs de choix pour étudier la diversité inter et intra spécifique du lupin marocain. Les ADN des quatre espèces de lupin utilisées *L. albus*, *L. luteus, L. cosentinii* et *L. angustifolius* ont été amplifiés par les marqueurs ISSR. 60 ng de l'ADN de chaque espèce ont été amplifiés dans 25 µl de mélange réactionnel contenant 10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 50 mM KCl; 25 mM $MgCl_2$; 0,5 mM dNTP; 4 mM d`amorce et 1 unité de Taq polymérase. Nous avons utilisé 16 amorces ISSR (Tableau II.2) dont 12 (FL1-FL12) sont spécifiques au Lupin (Talhinhas *et al*, 2003).

Tableau II.2. Liste des 16 différentes amorces ISSR utilisées dans l'étude de la diversité intra- et inter- spécifique du lupin marocain.

Code de l' amorce	**Séquence 5'- 3'**
F1	$(CA)_6$ AT
F2	$(CA)_6$ GC
F3	$(CA)_6$ AG
F4	$(AGC)_4$ T
FL1	$(AC)_8$ CA
FL2	$(AC)_8$ CG
FL3	$(AC)_8$ CT
FL4	$(AG)_8$ CC
FL5	$(AG)_8$ CG
FL6	$(CA)_8$ AG
FL7	$(CA)_8$ AC
FL8	$(GA)_8$ CC
FL9	$(GA)_8$ CG
FL10	$(GA)_8$ CT
FL11	$(GT)_8$ CC
FL12	$(GT)_8$ CG

La PCR est optimisée selon le programme d'amplification suivant:
Une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s suivie de 40 cycles avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s, une hybridation à 45°C pendant 45s et une étape d'élongation à 72°C pendant 2mn. L'amplification est bouclée par une étape d'élongation à 72°C pendant 7mn.
Les produits d`amplification ISSR sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d`agarose (1,5 %) pendant 2 heures. Après la révélation des gels au bromure d`ethidium et exposition aux UV les images des gels sont enregistrés sur ordinateur pour un traitement ultérieure avec le logiciel Gel comparII.

II-1-5 Les marqueurs AFLP

Les marqueurs AFLP ont été choisis pour étudier la diversité inter- spécifique entre les quatre espèces du lupin marocain. Le protocole des AFLP développé en 1995 par Vos *et al*. a été utilisé comme plateforme lors de notre étude. Ce protocole de base à été sujet de quelques modifications afin de l'adapter aux conditions de notre laboratoire.
Le protocole d'AFLP consiste en quatre étapes essentielles:
Une étape de digestion de l`ADN génomique du lupin par deux endonucleases EcoRI ayant comme site de restriction G-AATTC et Tru9I (isoschizomére de MseI) ayant pour site de restriction T-TAA. Lors de cette étape nous avons digéré 1100 ng d'ADN de lupin avec 10 unités d`EcoRI et 5 unités de Tru9. La digestion est optimisée dans le tampon B (promega) [6 mM Tris-HCl; 6 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl et 1 mM DTT] à (pH 7.5) et à 37°C pendant 2 heures. L'enzyme est inactivée à +80°C pendant 15 mn. La vérification de la réussite de la digestion est réalisée par visualisation des produits de la digestion par électrophorèse sur gel d'agarose. La deuxième étape, consiste en une ligation des fragments d'ADN digérés aux adaptateurs ayant des bouts cohésifs aux extrémités digérées. L'adaptateur- EcoRI présente la séquence suivante:

5-CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA-5

Et l'adaptateur MseI présente la séquence suivante:

5-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-5

Ces adaptateurs sont caractérisés aussi par leur séquence complémentaire à celle des amorces de la pré-amplification. La ligation est optimisée dans 40 µl de mélange réactionnel contenant

Tableau II.3. Liste des 25 combinaisons d'amorces AFLP utilisées dans l'étude de la diversité inter- spécifique du lupin du Maroc.

Amorces MseI Amorces EcoRI	M- CAC	M- CAG	M- CAT	M- CTA	M- CTC
E- ACC	+	+	+	+	+
E- ACG	+	+	+	+	+
E- ACT	+	+	+	+	+
E- AGC	+	+	+	+	+
E- AGG	+	+	+	+	+

L`ADN digéré, 5 pM d'adaptateur EcoRI et 50 pM d'adaptateur MseI, 10 mM d'ATP, 300 mM Tris-HCL (PH 7.8), 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT et 1,5 unités de T4 ligase (promega). La ligation est optimisée à 37°C pendant 3 heures. Cette étape peut aussi être vérifiée par visualisation des produits de la ligation après électrophorèse sur gel d'agarose.

La troisième étape du protocole d'AFLP consiste en une pré- amplification ou encore appelée PCR non sélective. Cette PCR est basée sur l'utilisation de deux amorces; EcoRI primer 0 dont la séquence est 5' GACTGCGTACCAATTC 3' et l'amorce MseI primer 0 dont la séquence est 5' GATGAGTCCTGAGTAA 3'. L'amplification est optimisée dans 15 µl de mélange réactionnel contenant 5µl des produits de la ligation dilués 10 fois avec 10 mM Tris-HCl et 0,1 mM EDTA (pH 8.0), 50 ng d'amorce EcoRI, 50 ng d'amorce MseI, 10 mM de dNTP, 25 mM $MgCl_2$, 1 unités de Taq polymérase (promega). La PCR est optimisée dans l'amplificateur Amplitron II selon le programme suivant:

19 cycles avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s, une hybridation à 56°C pendant 30s et une élongation à 72°C pendant 1 mn. L`amplification est vérifiée par visualisation des amplifiats par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 %. La quatrième étape d'AFLP consiste en une amplification sélective à partir des produits pré-amplifiés positifs en utilisant 25 combinaisons d'amorces (Tableau II.3).

La PCR est optimisée dans 25 µl de mélange réactionnel contenant 50 ng d'amorce EcoRI+3, 50 ng d'amorce MseI+3, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 1 Unités de Taq polymérase (Promega) et avec 5 µl des produits d'amplification de la PCR 1 dilués 10 fois avec 10 mM Tris-HCl et 0,1 mM EDTA (pH 8.0). La PCR est ensuite réalisée selon le programme suivant:

11 cycles d'une étape de dénaturation de 30 s à 94°C, une étape d'hybridation de 30 s à 64°C (-0.7°C/cycle) et une étape d'élongation de 1 mn à 72°C. Ceci suivit par 23 cycles avec une étape de dénaturation de 30 s à 94°C, une étape d'hybridation de 30 s à 56°C et une étape d'élongation de 1 mn à 72°C.

Les produits de l'amplification sélective sont séparés par électrophorèse et en conditions dénaturantes sur gel de poly-acrylamide 6% pendant 16 h à 200V (2 mA). Les amplifiats sont prétraités en leur ajoutant le même volume du tampon de charge d'AFLP contenant 9 volumes de formamide et 1 volume du tampon [Blue/orange loading dye] [0,4 % Orange G, 0,03 % Bleu de Bromophénol, 0,03 % Xylène Cyanol FF, 15% Ficoll® 400, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM EDTA (pH 8.0) (promega)]. Les échantillons sont dénaturés pendant 5 mn à 95°C et ensuite

séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide pendant 16 heures à 200V en présence du tampon de migration TBE 1X. L'électrophorèse est réalisée sur un système T-Rex^{TM} Aluminium Backed Sequencer (Owl, Portsmouth, England). La révélation des gels d'acrylamide se fait par coloration au nitrate d'argent. Les détails techniques du protocole d'AFLP utilisé sont présentés dans l'annexe II.1.

II-1-6 Analyse des résultats

Les gels obtenus après migration électrophorétique des produits PCR ISSR et AFLP sont numérisées et enregistrés sous une haute résolution. Les images sont traitées par le logiciel GelComparII (version 2,5, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Seules les bandes nettes obtenues aussi appelées marqueurs sont détectées. Ces bandes sont notées '1' pour présence et '0' pour absence. A partir des matrices de présence /absence, nous avons calculé l'indice de diversité ou PIC (Polymorphism Information Content) décrit par Bostein *et al*. (1980) et modifié par Anderson *et al*. (1993):

$$PIC = 1 - \sum P^2ij$$

Pij étant la fréquence du marqueur révélée par l'amorce j.

Par la suite, nous avons comparé les différents échantillons étudiés par paires. Les distances génétiques ont été calculées à l'aide de l'indice de diversité de Dice. Cet indice peut se calculer comme suit:

$$GS_{xy} = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

a: le nombre d`allèles communs aux deux populations x et y.

b: le nombre d'allèles dans la population x.

c: le nombre d'allèles dans la population y.

A partir des distances génétiques calculées entre les différents échantillons étudiés une classification hiérarchique en UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average) ainsi qu'une représentation tridimensionnelle ou multidimensional scaling (MDS) ont été élaborées moyennant GelComparII.

Les dendrogrammes et les MDS ont engendré un certain nombre de groupes et sous groupes. Ces groupes formés ont été comparés sur la base de leur diversité calculée par l'indice de diversité de Nei comme suit:

$$I_{ij} = 2 P_{ij} (1 - P_{ij})$$

Pij étant la fréquence d'un marqueur i dans la population j.

Par la suite, une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée à partir des matrices présence/ absence et en utilisant le logiciel XLSTAT 2009.

Figure II.3: Profils RAPD de *L. luteus* révélés par 11 amorces (E2-4, G2, G3, I2-4, H3, H4 et H5).

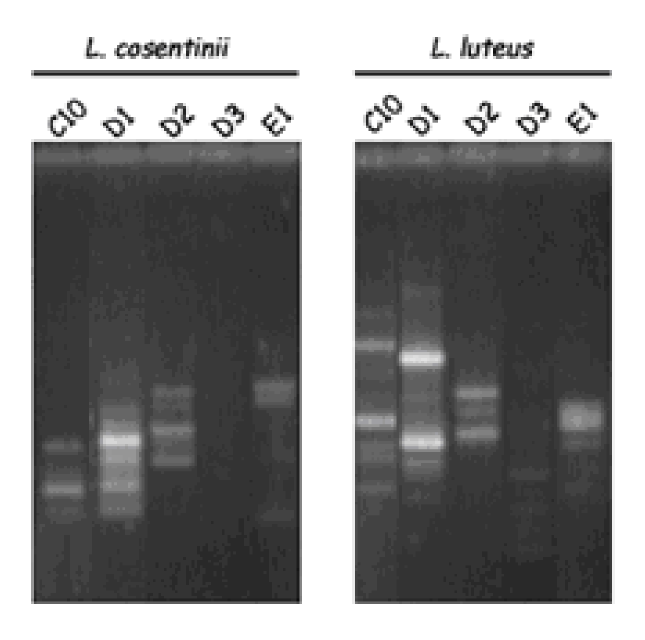


Figure II.4: Profils RAPD de *L. luteus* et de *L. cosentinii* révélés par 5 amorces (C10, D1-3, et E1).

II-2- Résultats

II-2-1- Analyse de la diversité inter- spécifique

Dans l`étude de la diversité inter- spécifique, les ADN des trois espèces de lupin *L. albus, L. cosentini* et *L. luteus* ont été utilisés sous forme de bulk. Pour chacune des espèces l`ADN a été extrait à partir de feuilles des différentes accessions à part égale. L'ADN bulk de *L. albus* a été extrait à partir des feuilles des 10 accessions de cette espèce, celui de *L. luteus* a été extrait à partir des 9 accessions de cette espèce et l'ADN bulk de *L. cosentinii* a été extrait à partir des 22 accessions de cette espèce. Pour *L. angustifolius*, nous avons utilisé l'ADN extrait à partir des feuilles de la seule accession mise à notre disposition par l'INRA.

II-2-1-1 Polymorphisme révélé par les marqueurs RAPD

Au cours de cette étude préliminaire, les marqueurs RAPD ont été utilisés pour analyser la diversité inter- spécifique entre deux espèces de lupin. Une espèce sauvage, *L. cosentinii* dont les échantillons ont été collectés dans la région de Rabat- Hay riad et une espèce cultivée *L. luteus* de la région de Kénitra.

Les ADN ont été extraits à partir des deux espèces de lupin et amplifiés moyennant 97 amorces RAPD (Operon technologique, Almeda) selon le protocole d`amplification préalablement optimisé. Les premiers résultats d`amplifications par PCR-RAPD révèlent un haut niveau de polymorphisme chez les deux espèces (Figures II.3 et II.4).

Chez *L. luteus,* des 97 amorces RAPD essayées 76 (78,3%) ont généré des profils électrophorètiques lisibles. Il s'agit de: AD2, AF2-5, AI15, AJ12, AK1, AK2, AK4, AM1, AM2, AM4, AM9, AN1, AN3, AN5, AN12, C1, C3-7, D1-5, D15, D20, E1-4, F2-5, G2-4, H1-5, I2-5, M1, R1-3, R11, S3-8, S18, T1-8, T16, U2, U3, U9, Y15.

Chez *L. cosentinii,* des 97 amorces RAPD utilisées 27 (27,8 %) marqueurs RAPD ont permis de générer des profils électrophorètiques nettes AF2-4, AK2-4, AN3, B10, C1-4, C6, D1, D2, D5, E1, E3, E4, F1, F5, G1, H3, H4, M1, S6-8, T1, T4, T5, T6, U2, U3, U9.

Les profils RAPD obtenus chez les deux espèces de lupin ont montré une hétérogénéité électrophorètique intéressante. Néanmoins, nous avons révélé la non reproductibilité au niveau de certains marqueurs. Ainsi, l'étude de la diversité du lupin moyennant les marqueurs RAPD a été abandonnée pour choisir d'autres marqueurs moléculaires.

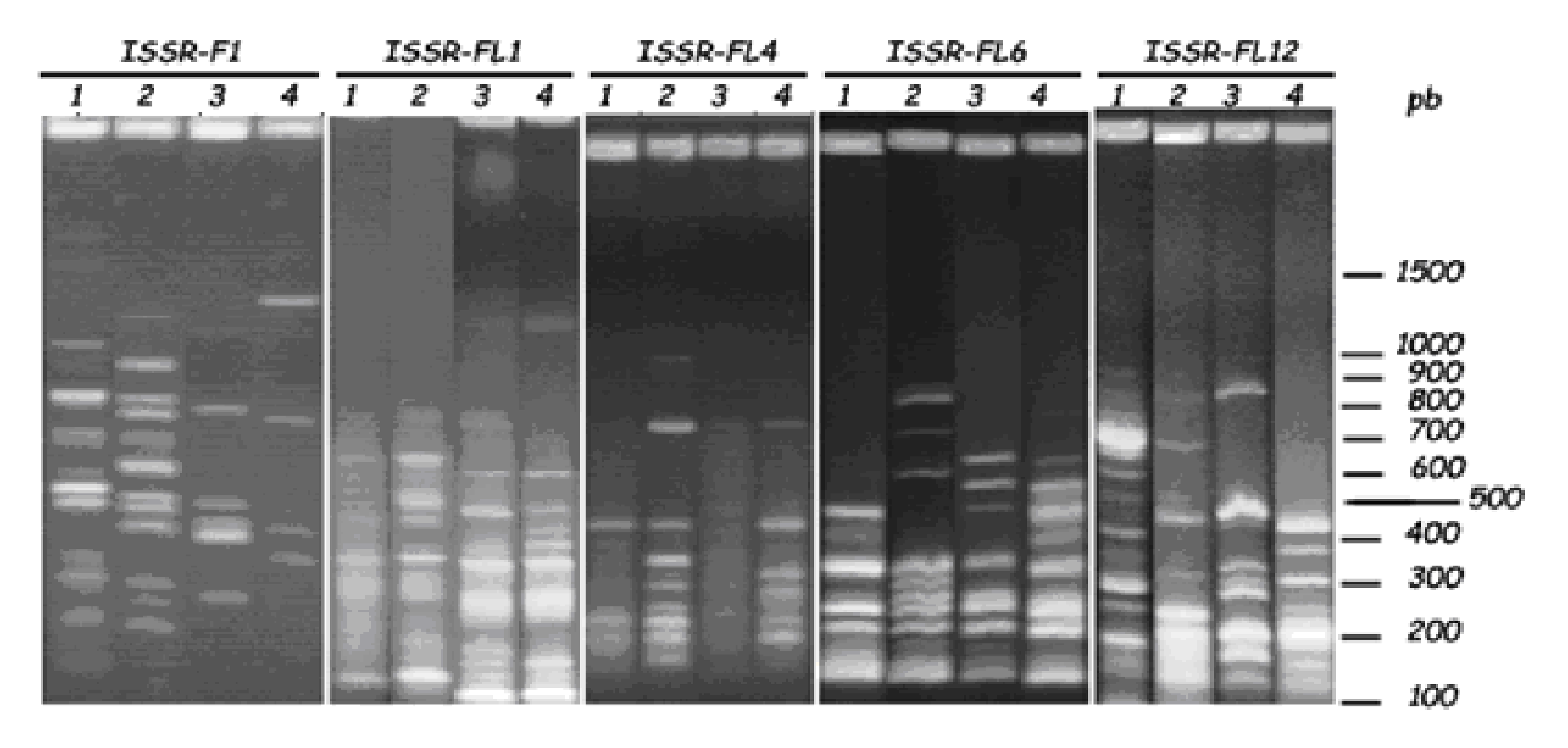


Figure II.5: Profils électrophorétiques ISSR des quatre espèces de lupin étudiées moyennant les amorces ISSR-F1, ISSR-FL1, ISSR-FL4, FL6 et FL12.

1: *L. albus,* 2*: L. luteus,* 3*: L. cosentinii et* 4*: L. angustifolius.*
Le 100 pb DNA ladder est utilisé comme marqueur de poids moléculaire.

II-2-1-2 Apport des marqueurs ISSR dans l'étude de la diversité inter- spécifique

Les marqueurs ISSR ont été les premiers marqueurs de choix pour étudier la diversité inter-spécifique. Lors d'une étude précédente sur la caractérisation moléculaire du lupin, les marqueurs ISSR ont permis de révéler un haut niveau de polymorphisme (Figure II.5).

L'étude inter- spécifique a porté sur les quatre espèces de lupin; *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii* et *L. luteus.* Chaque espèce a été représentée par un ADN bulk de l'ensemble de ses accessions.

Des 16 amorces ISSR testées (Tableau II.2), cinq amorces (31,25%) [F3, F4, FL8, FL10 et FL11] ont générées des profils d'amplification non lisible. 11 amorces (68,75 %) [F1-3, FL1-7 et FL9) ont montrées des profils d`amplification lisibles avec un nombre intéressant de bandes (Figure II.5). En effet, 184 bandes ISSR ont été enregistrées avec 160 (87%) fragments polymorphes.

Chez *L. albus,* 76 bandes ont été engendrées avec 6,33 bandes par amorce. Le nombre de fragments varie de 5 (FL1) à 8 (F1, F2, FL4 et FL6). La taille de ces fragments varie entre 110,28pb et 1126pb (Tableau II.4).

Chez *L. angustifolius*, 74 bandes ont été détectées avec 6,16 bandes par amorce ISSR utilisé. Le nombre des bandes varie de 5 (F2) à 8 (F1 et FL5). La taille des bandes observées varie entre 51,95 pb et 873,35 pb (Tableau II.4).

Chez *L. cosentinii*, 93 bandes ont été obtenues moyennant les marqueurs ISSR, avec comme moyenne 7,75 bandes par amorce. Le nombre de bandes varie de 5 (F2 et FL1) à 10 (FL3 et FL4). La taille des fragments générés oscille entre 110,28 pb et 817,44 pb (Tableau II.4).

Chez *L. luteus,* 67 bandes ont été générées par les marqueurs ISSR avec une moyenne de 5,58 bandes par amorce. Le nombre de bandes varie entre 4 (F2, FL1 et FL4) et 8 (F1 et FL6). La taille des bandes obtenues varie entre 110,28 pb et 775,85 pb (Tableau II.4).

Tableau II.4: Liste des amorces ISSR utilisées dans l'étude inter- spécifique des quatre espèces de lupin, les marqueurs générés pour chaque amorce ISSR et la taille des marqueurs engendrés.

Espèce	Amorce	Marqueurs générés	Taille des bandes obtenues	PIC	marqueurs spécifiques
Albus	F1	8	159,43pb- 568,95pb	0,88	180,64pb
	F2	8	137,62pb- 304,32pb	0,85	304,32pb; 272,02pb,
	FL1	5	147,21pb- 1126pb	0,91	1126pb; 422,49pb; 378,90pb; 350,11pb; 238,96pb
	FL2	6	143,26pb- 543,48pb	0,93	543,48pb; 162,22pb,
	FL3	7	139,19pb- 992pb	0,94	992pb; 864,75pb
	FL4	8	156,50pb- 621,09pb	0,89	0
	FL5	7	142,02pb- 637,87pb	0,92	637,87pb; 468,73pb; 354,81pb
	FL6	8	124,05pb- 538,95pb	0,92	219,25pb
	FL7	6	155,09pb- 371,60pb	0,92	233,12 pb
	FL9	6	110,28pb- 323,63pb	0,911	0
	FL12	7	159,30pb- 775,85pb	0,93	0
	Total	76	110,28pb- 1126pb	0,909± 0,026	17
Angustifolius	F1	8	51,95pb- 154,73pb	0,88	551,95pb; 173,44pb; 154,73pb
	F2	5	137,62pb- 282,80pb	0,85	282,80pb; 221,93pb
	FL1	6	147,21pb- 625,52pb	0,91	625,52pb; 495,50pb, 255,62pb; 196,32pb
	FL2	7	143,26pb- 332,48pb	0,93	263,06pb; 172,86pb
	FL3	6	139,19pb- 389,33pb	0,94	0
	FL4	7	183,20pb- 621,09pb	0,89	457,21pb; 396,50pb; 310,24pb
	FL5	8	142,02pb- 783,18pb	0,92	783,18pb; 613,93pb; 551,96pb; 404,37pb; 341,19pb
	FL6	7	134,13pb- 538,95pb	0,92	0
	FL7	6	155,09pb- 371,60pb	0,92	0
	FL9	7	119,79pb- 323,63pb	0,911	119,79pb
	FL12	7	126,43pb- 873,35pb	0,93	873,35pb; 645,81pb; 551,38pb; 126,43pb
	Total	74	51,95pb- 873,35pb	0,909± 0,026	24
Cosentinii	F1	7	159,43pb- 568,95pb	0,88	0
	F2	5	137,62pb- 317,59pb	0,85	317,59pb
	FL1	5	165,30pb- 654,92pb	0,91	654,92pb; 444,85pb; 285,76pb
	FL2	7	143,26pb- 525,90pb	0,93	525,90pb; 150,20pb
	FL3	10	139,19pb- 677,40pb	0,94	344,56pb; 278,00pb; 238,31pb; 193,99pb
	FL4	10	130,53pb- 926pb	0,89	926pb; 296,01pb; 201,61pb; 130,53pb
	FL5	8	142,02pb- 514,58pb	0,92	442,63pb; 383,80pb; 383,80pb
	FL6	8	134,13pb- 817,44pb	0,92	817,44pb; 768,01pb; 634,61pb; 500,00pb; 272,31pb; 174,54pb
	FL7	8	155,09pb- 767,12pb	0,92	767,12pb; 767,10pb; 254,10pb
	FL9	8	110,28pb- 640,30pb	0,911	640,30pb; 501,48pb; 432,28pb; 349,79pb
	FL12	7	149,26pb- 399,74pb	0,93	355,23pb; 234,22pb; 198,69pb; 171,40pb
	Total	**93**	**110,28pb- 817,44pb**	**0,909± 0,026**	**34**

Tableau II.4. (Suite): Liste des amorces ISSR utilisées dans l'étude interspécifique des quatre espèces de lupin, les marqueurs générés pour chaque amorce ISSR et la taille des marqueurs engendrés.

Espèces	**Amorce**	**Marqueurs générés**	**Taille des bandes obtenues**	**PIC**	**marqueurs spécifiques**
L. luteus	F1	8	159,43pb- 568,95pb	0,88	-
	F2	4	151,41pb- 408,67pb	0,85	408,67pb; 246,13pb
	FL1	4	165,30pb- 569,04pb	0,91	470,15pb
	FL2	7	143,26pb- 470,15pb	0,93	470,15pb
	FL3	7	139,19pb- 677,40pb	0,94	581,99pb; 504,35pb
	FL4	4	156,50pb- 362,91pb	0,89	0
	FL5	5	142,02pb- 699,95pb	0,92	699,95pb
	FL6	8	134,13pb- 414,87pb	0,92	160,68pb
	FL7	7	178,28pb- 572,81pb	0,92	435,18pb
	FL9	7	110,28pb- 299,82pb	0,911	0
	FL12	6	149,26pb- 775,85pb	0,93	428,69pb; 286,75pb
	Total	67	110,28pb- 775,85pb	0,909± 0,026	11

Le tableau II.4 résume le nombre des marqueurs spécifiques obtenus pour chaque espèce et pour chaque amorce. Le nombre de ces marqueurs est variable d'une espèce à une autre.

Chez *L. albus*, des 76 marqueurs générés, 17 (22,3 %) ont été spécifiques avec une moyenne de 1,5 marqueurs spécifiques par amorce.

Chez *L. angustifolius*, des 74 marqueurs obtenus, 24 (32,4%) se sont révélés spécifiques pour cette espèce avec en moyenne 2,18 marqueurs spécifiques par amorce.

Chez *L. cosentinii*, des 93 marqueurs obtenus 34 (36,5%) ont été spécifiques à cette espèce avec une moyenne de 3,09 marqueurs par amorce utilisée.

Chez *L. luteus*, des 67 marqueurs obtenus, 11 (16,4%) ont été spécifiques pour cette espèce avec une moyenne de un marqueur spécifique par amorce.

La diversité des quatre espèces de lupin révélée par les marqueurs ISSR a été évaluée en utilisant l'indice de diversité de Nei Iji.

La plus grande diversité a été observée chez *L. cosentinii* (Iij=0,01076) suivi de *L. angustifolius* (0,010747) et de *L. albus* (0,010746). La plus faible diversité a été notée chez *L. luteus* avec 0,1073 comme valeur de l'indice de Nei. Toutefois, on remarque que ces valeurs de diversité sont très proches.

II-2-1-2 a Distances génétiques

Les distances génétiques ont été calculées à partir des marqueurs ISSR générés en utilisant l'indice de Dice, et sont représentées dans le tableau II.5. On remarque une similarité importante entre les quatre espèces de lupin. La similarité la plus faible de 74% a été enregistrée entre *L. cosentinii* et *L. angustifolius*. Et, la similarité la plus élevée a été notée entre *L. albus* et *L. luteus* avec 78,1%.

Tableau II.5: Similarités calculées entre les quatre espèces de lupin sur la base des marqueurs ISSR.

	L. albus	***L. luteus***	***L. angustifolius***	***L. cosentinii***
L. albus	100			
L. luteus	78,1	100		
L. angustifolius	76,2	77,8	100	
L. cosentinii	75,4	76,3	74,0	100

II-2-1-2 b Classification hiérarchique

La classification hiérarchique en UPGMA (Figure II.6) des quatre espèces de lupin a été générée sur la base des distances génétique de Dice. Le résultat est présenté dans le dendrogramme suivant.

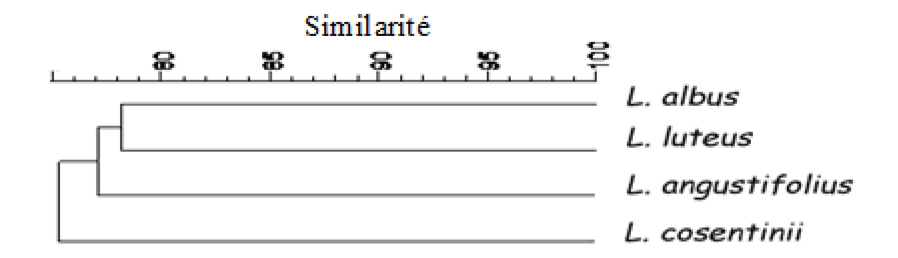


Figure II.6. Classification en UPGMA des quatre espèces de lupin sur la base des marqueurs ISSR.

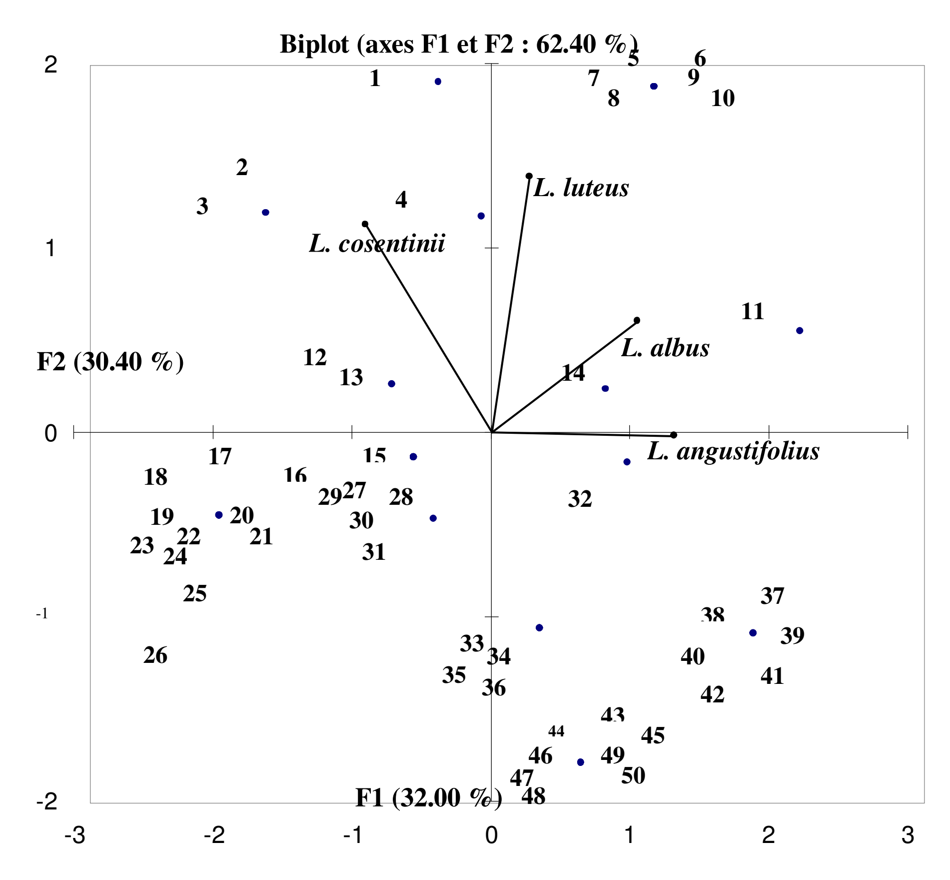


Figure II. 7. Analyse en composante principale (ACP) des quatre espèces de lupin selon les marqueurs ISSR.

1: *FL3: 677,40 pb,* ***2****: FL12:149,26 pb,* ***3****: FL1:392,09 pb,* ***4****: FL9:185,86 pb,* ***5****: F1:240,92 pb,* ***6****: FL5:192,22 pb,* ***7****: F2:188,23 pb,* ***8****: F1:191,65 pb,* ***9****: FL9:264,04 pb,* ***10****: F1:268,73 pb,* ***11****: FL6:414,87 pb,* ***12****: FL7:319,05 pb,* ***13:*** *F2:211,89 pb,* ***14****: FL12:255,80 pb,* ***15****: FL3:581,99 pb,* ***16****: FL7:435,18 pb,* ***17****: FL9:501,48 pb,* ***18:*** *FL7:767,10 pb,* ***19****: FL3:238,31 pb,* ***20****: FL6:174,54 pb,* ***21****: FL3:344,56 pb,* ***22****: FL5:383,80 pb,* ***23****: FL1:285,76 pb,* ***24****: FL1:654,92 pb,* ***25****: FL7:767,12BP pb,* ***26****: FL12:198,69 pb,* ***27****: FL12:428,69 pb,* ***28****: FL3:504,35 pb,* ***29****: F2: 246,13 pb,* ***30****: FL6:160,68 pb,* ***31****: FL6:253,25 pb,* ***32:*** *F1:459,09 pb,* ***33****: F1:180,64 pb,* ***34****: F2:272,02 pb,* ***35****: FL5:468,73 pb,* ***36****: FL1:422,49 pb,* ***37****: FL1:147,21 pb,* ***38****: FL9:323,63 pb,* ***39****: FL7:205,55 pb,* ***40****: FL12:216,86 pb,* ***41****: FL1:185,39 pb,* ***42:*** *FL2:242,69 pb,* ***43****: F1:154,73 pb,* ***44****: FL4:396,50 pb,* ***45****: FL2:263,06 pb,* ***46****: FL1:495,50 pb,* ***47****: FL5:551,96 pb,* ***48****: FL12:873,35 pb,* ***49****: FL1:196,32 pb,* ***50****: FL5:783,18 pb.*

II-2-1-2 c Analyse en composantes principales

Les données ISSR ont été analysées par le logiciel XLSTAT 2009 pour générer une représentation bidimensionnelle des quatre espèces de lupin (Figure II.7). L'analyse en composante principale ACP permet de visualiser le lien entre les quatre espèces ainsi que la contribution des marqueurs ISSR dans cette représentation. L'annexe II. 2 résume la contribution de ces marqueurs.

Les deux premiers axes F1 et F2 représentent 32 et 30,39 % de la variabilité totale. Le tableau II.6 résume les valeurs propres et la variabilité des deux axes. La contribution de chacun des marqueurs ISSR dans cette distribution a été résumée dans l'annexe II.2.

Tableau II.6. Valeur propre, variabilité et pourcentage cumulé des deux premiers axes de l'ACP

	Axe F1	**Axe F2**
Valeur propre	1,280	1,216
Variabilité (%)	32,002	30,399
% cumulé	32,002	62,400

II-2-1-3 Apport des marqueurs AFLP dans la diversité inter- spécifique

L'étude de la diversité inter- spécifique du lupin par les marqueurs AFLP a été menée sur *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii* et *L. luteus*.

10 combinaisons d'amorces AFLP (Tableau II.3) ont été utilisées et ont permis d'engendrer des profils électrophorétiques très hétérogènes (Figure II.8). Le nombre de bandes AFLP obtenues a été variable d'une espèce à une autre et selon l`amorce utilisée (Tableau II.7). Aussi, et sur un ensemble de 510 bandes générées (avec 51 bandes par amorce), 457 (89,6%) ont été polymorphes.

Chez *L. albus*, 234 bandes AFLP ont été générées avec une moyenne de 23,4 bandes par amorce. Le nombre de ces fragments variait de 16 (E-ACC/ M-CAG) à 33 (E-ACT/M-CAG). La taille des bandes obtenues allait entre 138,28 pb et 2157 pb. Les amorces utilisées ont été très informatives d'où les valeurs de PIC entre 0,93 et 0,98 avec une moyenne de 0,95 et un écart type de 0,0125.

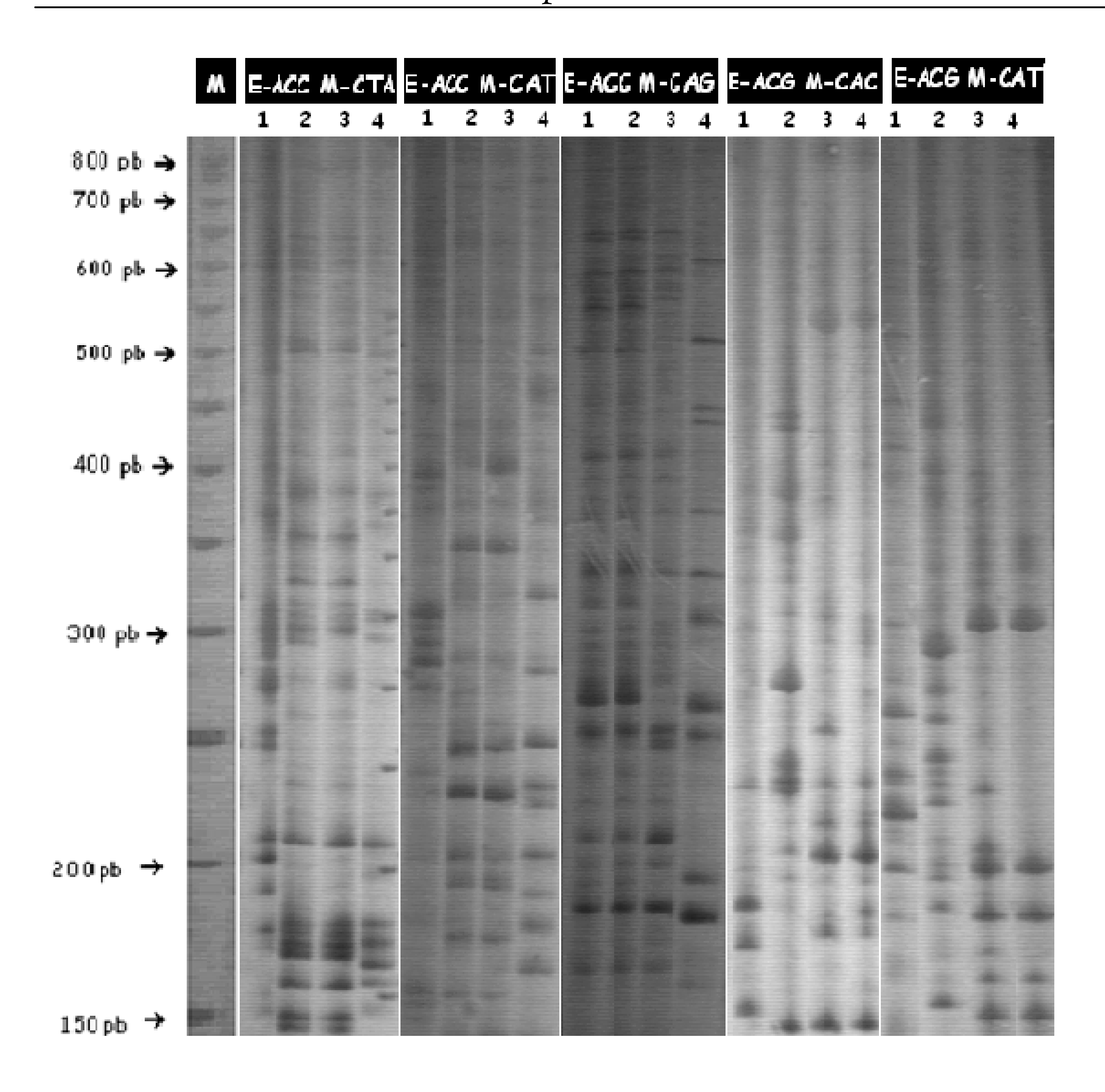


Figure II.8: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide d'amplifiats AFLP de quatre espèces de lupin marocain par 5 combinaisons d'amorces.

M : Marqueur de poids moléculaire 50pb
1 : *Lupinus luteus;* 2 : *Lupinus angustifolius;* 3 : *Lupinus cosentinii* et 4 : *Lupinus albus*

Chez *L. angustifolius*, 277 bandes AFLP ont été générées avec une moyenne de 27,7 bandes par amorce. Le nombre des fragments obtenus variait entre 17 (E-AGG/ M-CTC) et 36 (E-ACT/M-CAT). La taille des bandes obtenues variait entre 134,26pb et 2709pb. Les valeurs de PIC ont été variables entre 0,94 et 0,97 avec une moyenne de 0,957 et un écart type de 0,0078.

Chez *L. cosentinii*, 275 fragments AFLP ont été obtenus avec une moyenne de 27,5 bandes par amorce utilisée. Le nombre de fragments générés variait de 15 (E-ACG/M-CAG) à 43 (E-ACT/M-CAT). La taille de ces bandes allait entre 134,26 et 2343 pb. Les valeurs de l'indice de diversité ou PIC variaient de 0,93 à 0,97 avec une moyenne de 0,957 et un écart type de 0,01345.

Chez *L. luteus*, un total de 278 bandes AFLP ont été notées avec une moyenne de 27,8 bandes par amorce. Le nombre des fragments AFLP allait de 16 (E-ACG/M-CAG) à 38 (E-ACT/M-CAG). Le poids moléculaire de ces fragments variait entre 130,51pb et 1827pb. Les amorces utilisées ont été très informatives avec des valeurs de PIC proche de 1. Les valeurs de PIC variaient entre 0,93 et 0,97 avec une moyenne de 0,956 et un écart type de 0,011135.
Des 1064 fragments AFLP enregistrés, on remarque que plusieurs bandes sont communes aux différentes espèces. Néanmoins, on note que 322 à savoir 30,26 % des marqueurs étaient spécifiques (Tableau II.8):

- 101 soit 43,16% des marqueurs se sont révélés spécifiques pour *L. albus,* avec une moyenne de 10 marqueurs par amorce. Le nombre de ces marqueurs variait de 2 (E-ACC/M-CAG et E-ACG/M-CAC) à 52 (E-ACT/M-CAT).
- 60 (21,66%) marqueurs spécifiques pour *L. angustifolius* avec une moyenne de 6 marqueurs par amorce. Le nombre de ces marqueurs variait entre 1 (E-ACC/M-CAG, E-ACT/M-CAG et E-AGG/M-CTC) et 21 (E-ACT/M-CAT).
- 75 (27,27%) des marqueurs été spécifiques pour *L. cosentinii* avec en moyenne 7,5 marqueur par amorce. Le nombre de ces marqueurs allait de 2 (E-ACC/M-CAT et E-ACG/M-CAG) à 31 (E-ACT/M-CAT).
- 86 (30,9%) marqueurs spécifiques pour *L. luteus* avec une moyenne de 8,6 marqueurs par amorce. Le nombre de ces fragments été variable entre 3 (E-ACG/M-CAG) et 22 (E-ACT/M-CAT).

Tableau II.7. Liste des marqueurs AFLP générés pour chaque amorce utilisée chez les quatre espèces de lupin.

Espèce	Amorce	Marqueurs générés	Taille des marqueurs obtenus	PIC
L. albus	E-ACC M-CAG	16	155,07pb – 1031pb	0,93
	E-ACC M-CAT	21	158,79pb – 1459pb	0,95
	E-ACC M-CTA	23	145,43pb – 1014pb	0,95
	E-ACG M-CAC	18	141,19pb – 971pb	0,94
	E-ACG M-CAT	21	143,91pb – 1047pb	0,95
	E-ACT M-CAC	24	142,07pb – 1895pb	0,95
	E-ACG M-CAG	22	150,00pb - 861,37pb	0,95
	E-ACT M-CAG	33	141,00pb – 1319pb	0,96
	E-ACT M-CAT	31	138,28pb – 1690pb	0,98
	E-AGG M-CTC	25	143,81pb – 2157pb	0,96
	Total	234	138,28pb - 2157pb	0,952±0,0125
L. angustifolius	E-ACC M-CAG	29	159,29pb - 1163pb	0,96
	E-ACC M-CAT	33	134,26pb – 1174pb	0,96
	E-ACC M-CTA	31	136,36pb – 1060pb	0,96
	E-ACG M-CAC	25	141,19pb – 971pb	0,96
	E-ACG M-CAT	29	146,95pb – 1047pb	0,96
	E-ACT M-CAC	19	142,07pb – 1460pb	0,95
	E-ACG M-CAG	25	144,26pb - 711,48pb	0,95
	E-ACT M-CAG	33	141,00pb – 1126pb	0,96
	E-ACT M-CAT	36	138,28pb – 1690pb	0,97
	E-AGG M-CTC	17	148,97pb – 2709pb	0,94
	Total	277	134,26pb - 2709pb	0,957±0,0078
L. cosentinii	E-ACC M-CAG	32	159,29pb - 1163pb	0,96
	E-ACC M-CAT	24	134,26pb – 1390pb	0,95
	E-ACC M-CTA	34	136,36pb – 1060pb	0,97
	E-ACG M-CAC	25	141,19 pb – 971pb	0,96
	E-ACG M-CAT	25	143,91pb – 1047pb	0,94
	E-ACT M-CAC	19	142,07pb – 1599pb	0,93
	E-ACG M-CAG	15	149,99pb - 661,76pb	0,97
	E-ACT M-CAG	38	141,00pb – 1643pb	0,97
	E-ACT M-CAT	43	138,28pb – 1690pb	0,97
	E-AGG M-CTC	20	148,97pb – 2343pb	0,95
	Total	275	134,26pb - 2343pb	0,957±0,0134
L. luteus	E-ACC M-CAG	29	180,09pb - 1126pb	0,96
	E-ACC M-CAT	32	130,51pb – 1111pb	0,96
	E-ACC M-CTA	29	145,43pb – 1014pb	0,96
	E-ACG M-CAC	25	131,08pb - 847,59pb	0,96
	E-ACG M-CAT	28	142,07pb – 1460pb	0,96
	E-ACT M-CAC	31	132,37pb – 1047pb	0,96
	E-ACG M-CAG	16	144,26pb - 631,77pb	0,93
	E-ACT M-CAG	38	141,00pb – 963pb	0,97
	E-ACT M-CAT	31	138,28pb – 1572pb	0,96
	E-AGG M-CTC	19	148,97pb – 1827pb	0,94
	Total	278	130,51pb - 1827pb	0,956±0,0111

La comparaison des quatre espèces de point de vue diversité générée à été faite moyennant l'indice de diversité de Nei ou Iij. Selon les valeurs obtenues, La plus grande diversité a été observée chez *L. luteus* (0,0039151), suivi de *L. angustifolius* et *L. cosentinii* qui ont montré une valeur de diversité de 0,0039150. En outre la plus faible diversité a été observée chez *L. albus* (0,003913).

Tableau II. 8: Liste des marqueurs AFLP spécifiques obtenus pour chacune des espèces de lupin.

Espèce	*Amorce*	**Marqueurs spécifiques**
L. Albus	E-ACC M-CAG	576,31pb; 155,07pb
	E-ACC M-CAT	1459pb; 1316pb; 446,33pb; 233,37pb; 158,79pb
	E-ACG M-CAC	342,59pb; 327,44pb
	E-ACG M-CAG	861,37pb; 467,52pb; 406,84pb; 219,11pb
	E-ACG M-CAT	543,39pb
	E-ACT M-CAG	1042pb; 826,40pb; 548,52pb; 173,85pb
	E-ACT M-CAC	1895pb; 1706pb; 317,82pb; 171,25pb
	E-ACT M-CAT	1166pb; 1118pb; 562,24pb; 401,44pb; 395,41pb; 371,95pb; 279,58pb; 177,69pb
L. angustifolius	E-AGG-M-CTC	2157pb; 472,62pb; 362,25pb; 338,18pb; 268,03pb; 172,24pb; 154,31pb, 143,81pb
	E-ACC M-CAG	343,82pb
	E-ACC M-CAT	703,89pb; 606,22pb; 606,20pb; 295,64pb; 276,19pb; 269,96pb; 145,60pb
	E-ACC M-CTA	415,05pb; 382,25pb
	E-ACG M-CAC	634,86pb; 255,92pb; 237,89pb
	E-ACG M-CAG	449,99pb; 381,86pb; 185,86pb; 165,67pb
	E-ACG M-CAT	804,67pb; 344,85pb; 256,77pb; 217,97pb; 197,83pb
	E-ACT M-CAG	525,10pb
	E-ACT M-CAC	602,90pb; 360,44pb; 228,00pb
L. cosentinii	E-ACC M-CAG	910pb; 340,17pb; 189,16pb
	E-ACC M-CAT	1390pb; 582,97pb
	E-ACC M-CTA	804,86pb; 664,64pb; 613,31pb; 427,54pb
	E-ACG M-CAC	888,23pb; 841,23pb; 370,79pb; 360,84pb; 275,81pb
	E-ACG M-CAG	422,14pb; 149,99pb
	E-ACG M-CAT	448,37pb; 317,99pb; 298,96pb; 278,05pb; 212,38pb; 156,46pb
	E-ACT M-CAG	1643pb; 1235pb; 445,84pb; 286,53pb; 161,37pb
	E-ACT M-CAC	1599pb; 1380pb; 544,41pb; 148,69pb
L. luteus	E-AGG-M-CTC	716,00pb; 353,02pb; 275,12pb
	E-ACC M-CAG	975pb; 425,88pb; 411,82pb; 382,76pb; 283,80pb; 226,19pb; 210,19pb
	E-ACC M-CAT	130,51pb; 563,62pb; 423,73pb; 357,63pb; 348,87pb; 251,05pb; 186,13pb; 166,78pb; 148,37pb; 142,34pb
	E-ACG M-CAC	692,41pb; 435,03pb; 98pb; 168,08pb; 156,78pb; 146,26pb; 131,08pb
	E-ACG M-CAG	269,85pb; 176,69pb
	E-ACG M-CAT	562,89pb; 267,68pb; 228,71pb; 141,74pb; 137,50pb; 132,37pb
	E-ACT M-CAG	397,86pb; 267,26pb; 196,52pb; 183,79pb

II-2-1-3 a Distances génétiques

Les similarités entre les quatre espèces de lupin étudiées ont été calculées sur la base des marqueurs AFLP et en utilisant l'indice de Dice. Les résultats figurent dans le tableau II.9.

Les valeurs obtenues sont très importantes et traduisant ainsi une grande similarité entre les espèces étudiées. La similarité la plus faible (52,2%) a été notée entre *L. luteus* et *L. albus.* Aussi, la similarité la plus élevé a été obtenue entre *L. cosentinii* et *L. angustifolius* avec 63,9%. Des similarités intermédiaires ont été enregistrées pour d'autres couples d'espèces comme c'est montré dans le tableau II.9.

Tableau II.9 : Pourcentages de similarités calculés entre les différentes espèces de lupin sur la base des marqueurs AFLP.

	L. angustifolius	***L. cosentinii***	***L. albus***	***L. luteus***
L. angustifolius	100			
L. cosentinii	63,91	100		
L. albus	53,27	57,69	100	
L. luteus	56,67	52,33	52,24	100

II-2-1-3 b Classification hiérarchique

Sur la base des pourcentages de similarités calculés une classification en UPGMA des quatre espèces de lupin a été réalisée (Figure II.9).

Le dendrogramme obtenu illustre une classification probable entre les espèces analysées.

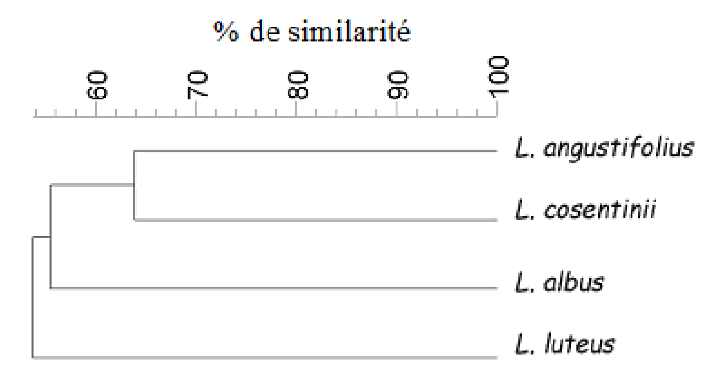


Figure II. 9: Classification en UPGMA des quatre espèces de lupin sur la base des marqueurs AFLP

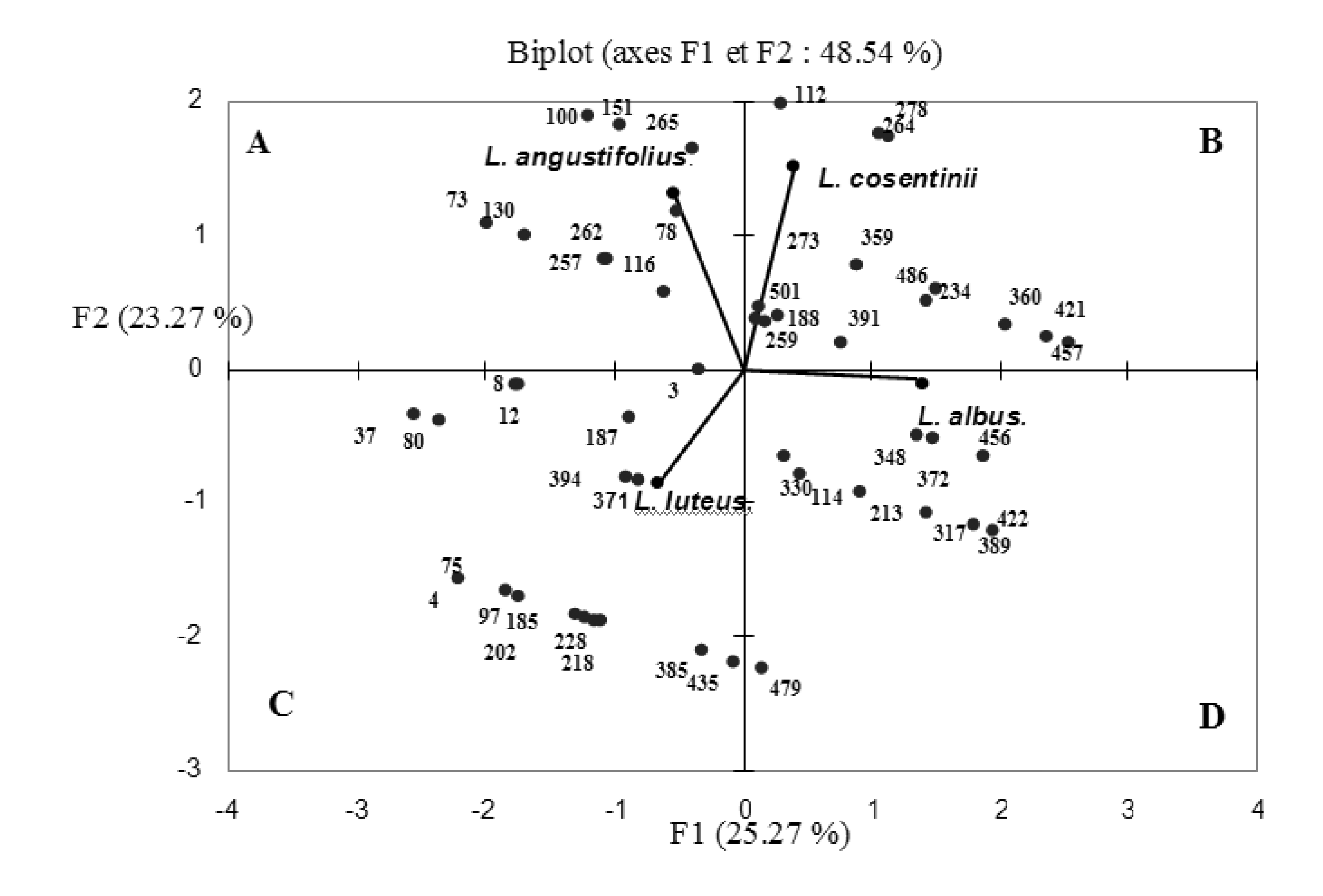


Figure II.10: Analyse en composante principale ACP des quatre espèces de lupin sur la base des marqueurs AFLP et sur les deux premiers axes F1 et F2.

3 : *E-ACC/M-CAG:1031pb*, ***4 :*** *E-ACC/M-CAG:975pb*, ***8:*** *E-ACC/M-CAG:817,83pb*, ***12 :*** *E-ACC/M-CAG:675,75pb*, ***37:*** *E-ACC/M-CAG:251,53pb*, ***73:*** *E-ACC/M-CAT:410,30pb*, ***75:*** *E-ACC/M-CAT:357,63pb*, ***78 :*** *E-ACC/M-CAT:325,89pb*, ***80:*** *E-AGG/M-CTC:862,54pb*, ***97:*** *E-ACC/M-CAT:148,37pb*, ***100:*** *E-ACC/M-CAT:138,11pb*, ***112 :*** *E-ACC/M-CTA:758,21pb*, ***114 :*** *E-ACC/M-CTA:717,92pb*, ***116:*** *E-ACC/M-CTA:664,64pb*, ***130:*** *E-ACC/M-CTA:365,81pb*, ***151:*** *E-ACC/M-CTA:164,52pb*, ***185:*** *E-ACG/M-CAC:310,98pb*, ***187:*** *E-ACG/M-CAC:302,29pb*, ***188:*** *E-ACG/M-CAC:284,87pb*, ***202:*** *E-ACG/M-CAC:156,78pb*, ***213:*** *E-ACG/M-CAG:467,52pb*, ***218:*** *E-ACG/M-CAG:390,63pb*, ***228:*** *E-ACG/M-CAG:269,85pb*, ***234:*** *E-ACG/M-CAG:207,64pb*, ***257:*** *E-ACG/M-CAT:488,99pb*, ***259:*** *E-ACG/M-CAT:448,37pb*, ***262:*** *E-ACG/M-CAT:404,99pb*, ***264:*** *E-ACG/M-CAT:384,24pb*, ***265:*** *E-ACG/M-CAT:366,67pb*, ***273:*** *E-ACG/M-CAT:278,05pb*, ***278:*** *E-ACG/M-CAT:241,81pb*, ***317:*** *E-ACT M-CAC:317,82pb*, ***330:*** *E-ACT/M-CAC:186,78pb*, ***348:*** *E-ACT/M-CAG:734,54pb*, ***359:*** *E-ACT/M-CAG:477,65pb*, ***360:*** *E-ACT/M-CAG:455,44pb*, ***371:*** *E-ACT/M-CAG:309,32pb*, ***372:*** *E-ACT/M-CAG:301,25pb*, ***385:*** *E-ACT/M-CAG:196,52pb*, ***389:*** *E-ACT/M-CAG:173,85pb*, ***391:*** *E-ACT/M-CAG:161,37pb*, ***394:*** *E-ACT/M-CAG:146,12pb*, ***421:*** *E-ACT/M-CAT:576,55pb*, ***422:*** *E-ACT/M-CAT:562,24pb*, ***435:*** *E-ACT/M-CAT:382,16pb*, ***456:*** *E-ACT/M-CAT:215,80pb*, ***457:*** *E-ACT/M-CAT:212,76pb*, ***479:*** *E-AGG/M-CTC:862,54pb*, ***486:*** *E-AGG/M-CTC:498,18pb*, ***501:*** *E-AGG/M-CTC:205,90pb.*

II-2-1-3 c Analyse en composantes principales

Une représentation en deux dimensions ou analyse en composante principale ACP a été réalisée (Figure II.10). Cette représentation permet d'avoir une vision sur les liens entre les espèces étudiées ainsi que de visualiser les marqueurs contribuant à cette représentation. La distribution a été effectuée selon les deux axes les plus informatifs F1 et F2 apportant 48,54 % de variabilité (Tableau II.10).

Plusieurs marqueurs AFLP ont contribués à la structuration des quatre espèces de lupin (Annexe II.3).

Pour ce qui est de l'analyse ACP à première vue, on peut diviser le nuage de points en quatre domaines, A; B; C et D. Dans le domaine A, *L. angustifolius* est appuyée par 8 marqueurs. Au niveau du domaine B, *L. cosentinii* est appuyé par 14 marqueurs. Dans le domaine C, 17 marqueurs contribuent à la représentation de *L. luteus*. Aussi, 10 marqueurs contribuent à la représentation de *L. albus* dans le domaine D.

Tableau II.10. Valeurs propre, variabilité et pourcentage cumulé des deux premiers axes de l'ACP basée sur les marqueurs ISSR.

	Axe F1	**Axe F2**
Valeur propre	1,175	1,045
Variabilité (%)	25,27	23,27
% cumulé	25,27	48,54

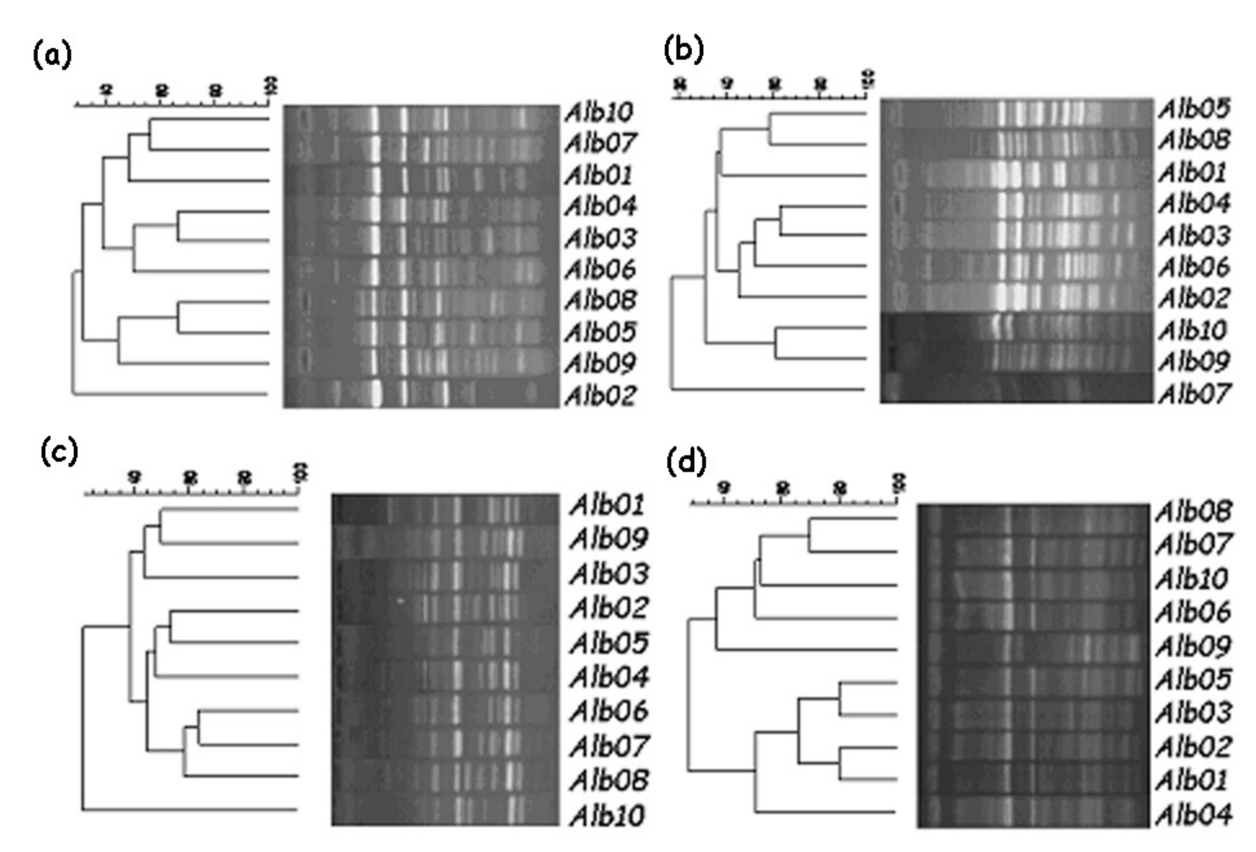


Figure II.11. Profils électrophorétiques ISSR d'accessions de *L. albus* obtenus moyennant l'amorce F1 (a), F2 (b), F3 (c) et F4 (d) et les classifications hiérarchiques correspondantes.

Tableau II.11: Marqueurs ISSR générés pour les dix accessions de *L. albus* et par amorce.

Amorce ISSR	Nombre de marqueurs générés									
	Alb01	*Alb06*	*Alb04*	*Alb03*	*Alb10*	*Alb07*	*Alb08*	*Alb05*	*Alb09*	*Alb02*
F1	8	10	8	10	11	12	14	14	12	6
F2	17	15	17	14	13	6	12	15	16	15
F3	13	9	10	11	8	9	10	9	11	11
F4	14	12	11	13	9	10	7	14	10	13
FL1	11	10	11	11	9	10	10	9	9	11
FL2	7	6	5	6	4	5	8	6	5	7
FL3	10	9	11	11	9	8	10	15	9	12
FL4	8	8	8	9	8	9	9	8	8	8
FL5	3	3	3	3	3	3	2	3	2	4
FL6	13	11	11	12	13	12	9	11	13	12
FL7	6	5	9	8	6	5	5	6	6	6
FL8	8	10	9	8	12	8	10	4	10	6
FL10	16	26	14	13	11	17	17	20	12	15
FL11	8	8	7	12	7	11	13	15	13	7

II-2-2 Analyse de la diversité intra- spécifique

II-2-2-1 Chez *Lupinus albus*

L`analyse intra-spécifique de *L. albus* sur la base des marqueurs ISSR a permis de générer des profils électrophorétiques très hétérogènes (Figure II.11). A l`aide des 15 amorces ISSR, 402 bandes ont été obtenues avec une moyenne de 26,8 bande par amorce. Le nombre de fragments générés a été variable selon l'amorce utilisée (Tableau II.11). Le nombre minimum de bandes a été révélé par l'amorce FL5 et le nombre maximum avec l'amorce FL10.
Le poids moléculaire de ces fragments variait entre 96,10 pb et 2928 pb. Moyennant ces marqueurs un taux de polymorphisme de 97,75% a été révélé. Aussi, les indices de diversité ou PIC ont été très importants, entre 0,91 et 0,97 avec une moyenne de 0,927 et un écart-type de 0,0509 (Tableau II.12).
La comparaison des 10 accessions d'*albus* sur la base des marqueurs ISSR générés montre qu'ils présentent en commun plusieurs fragments ISSR. Néanmoins, chaque accession a été caractérisée par au moins un marqueur unique (Tableau II.13). Ainsi, 64 (15,9%) marqueurs spécifiques ont été enregistrés. Le nombre de ces marqueurs par accessions a été variable. 1 marqueur spécifique pour Alb02; trois pour Alb06; quatre pour Alb05; six pour Alb04 et Alb07; sept pour Alb08; huit pour Alb03; neuf pour Alb01 et Alb10. Le maximum de marqueurs spécifiques (11) a été noté pour l'accession Alb09.

II-2-2-1 a *Distances génétiques*

Les similarités entre les différentes accessions de *L. albus* ont été calculées sur la base des 402 marqueurs ISSR obtenus et moyennant l'indice de Dice (Tableau II.14).
La similarité entre les accessions étudiées a été très importante et déduite selon les pourcentages obtenus. Les pourcentages de similarités variaient entre 70,1 et 82,5%.

Les similarités les plus faibles (70,1 et 70,8%) ont été enregistrées entre des accessions géographiquement éloignées; exemple Alb01 (Souk larbaa) et ALb10 (Marrakech). La similarité la plus importante (82,5%) a été obtenue entre deux populations de Bouznika; Alb03 et ALb04.
Des valeurs intermédiaires à celles-ci ont été obtenues comme résumé dans le tableau II.14.

Tableau II.12. Liste des amorces ISSR utilisées dans l'analyse de la diversité intra-spécifique de *L. albus*, le nombre de marqueurs engendrés, la taille de ces marqueurs, le nombre de marqueurs polymorphes et l'indice de diversité de ces marqueurs.

Amorce	Marqueurs générés	Taille des bandes obtenues	Marqueurs polymorphes	PIC
F1	30	151,24pb -1000pb	28	0,94
F2	36	137,65pb -2234pb	35	0,96
F3	25	1276pb -195,45pb	24	0,94
F4	26	2928pb -196,60pb	25	0,89
FL1	32	807,72pb -113,70pb	32	0,95
FL2	17	414,16pb - 96,10pb	17	0,91
FL3	34	1063pb -129,32pb	34	0,96
FL4	27	801,13pb -112,34pb	27	0,95
FL5	7	745,93pb -206,83pb	6	0,76
FL6	22	908pb -153,43pb	20	0,94
FL7	19	1230pb -128,60	19	0,91
FL8	26	1443pb -198,72pb	26	0,94
FL10	43	1752pb -148,89pb	43	0,97
FL11	30	1645pb -122,63pb	30	0,95
FL12	28	1333pb -149,94pb	27	0,94
Total	402	96,10pb – 2928pb	393 (97,7%)	0,927± 0,0509

Tableau II.13. Liste des marqueurs ISSR spécifiques générés dans l'analyse de la diversité intra-spécifique de *L. albus.*

Accession	Marqueurs ISSR spécifiques.
Alb01	F2:188,50pb, F2:255,40pb, F2:1109pb, FL4:132,15pb, FL4: 280,06pb, FL5:315,90pb, FL10:1439pb, FL10:917pb
Alb06	F1:167,31pb, FL10:1362pb, FL10:1326pb
Alb04	F1:841,45pb, F2:1276pb, FL3:846,06pb, FL4:112,34pb, FL7:866,64pb, FL8:261,99pb
Alb03	F1:209,43pb, F4:584,32pb, FL3:550,44pb, FL3:776,31pb, FL7:568,35pb, FL7:377,71pb, FL7:320,30pb, FL11:909pb
Alb10	FL1:164,33pb, FL1:229,23pb, FL1:247,90pb, FL1:572,91pb, FL3:129,32pb, FL4:801,13pb, FL8:755,15pb, FL8:486,11pb
Alb07	F1:151,24pb, F1:400,59pb, F2:322,36pb, F4:495,50pb, FL4:302,73pb, FL11:146,80pb
Alb08	FL1:113,70pb, FL2:321,92pb, FL2:414,16pb, FL3:1063pb, FL8:830,97pb, FL10:530,26pb, FL11:1052pb
Alb05	F1:933pb, FL2:103,69pb, FL3:348,86pb, FL10:780,04pb
Alb09	F2:212,46pb, FL1:185,93pb, FL1:255,34pb, FL1:563,51pb, FL2:391,30pb, FL3:138,89pb, FL8:511,43pb, FL8:207,85pb, FL11:416,72pb, FL11:122,63pb
Alb02	FL5:206,83pb

Tableau II.14. Matrice des similarités calculées entre les accessions de *L. albus* sur la base des marqueurs ISSR.

Alb08	*100*									
Alb07	*77,7*	*100*								
Alb06	*72,6*	*77,5*	*100*							
Alb05	*78,8*	*75,5*	*81,5*	*100*						
Alb10	*71,1*	*71,3*	*72,2*	*74,5*	*100*					
Alb09	*77,9*	*76,5*	*71,4*	*74,8*	*80,8*	*100*				
Alb04	*70,3*	*70,4*	*74,3*	*78,8*	*70,7*	*71,4*	*100*			
Alb03	*71,0*	*72,9*	*73,7*	*74,9*	*72,5*	*74,0*	*82,5*	*100*		
Alb02	*70,4*	*72,0*	*76,1*	*77,0*	*71,2*	*72,3*	*80,7*	*79,6*	*100*	
Alb01	*73,2*	*71,1*	*73,2*	*70,8*	*70,1*	*71,5*	*72,1*	*77,6*	*80*	*100*

Tableau II.15. Marqueurs ISSR uniques obtenus pour chacun des groupes de *L. albus*.

Groupe	Accession	Nombre de marqueurs	Moyenne Diversité	Nombre de marqueurs spécifiques	Marqueurs spécifiques
L.a GI	*Alb05-Alb06-ALb07-Alb08*	554	0,00208226	40	*F1 933pb, F1 400,59pb, F1 290,66pb, F1 167,31pb, F1 158,18pb, F1 151,24pb, F2:322,36pb, F3:715,21pb, F4:495,50pb, F4:314,43pb, FL1:770,80pb, FL1:365,36pb, FL1:271,31pb, FL1:262,90pb, FL1:127,09pb, FL1:113,70pb, FL2:414,16pb, FL2:321,92pb, FL2:103,69pb, FL2:96,10pb, FL3:1063pb, FL3:348,86pb, FL4:548,49pb, FL4:386,10pb, FL4:302,73pb, FL6:458,30pb, FL8:830,97pb, FL8:379,56pb, FL10:1362pb, FL10:1326pb, FL10:1187pb, FL10:780,04pb, FL10:554,14pb, FL10:530,26pb, FL10:340,63pb, FL11:1052pb, FL11:278,32pb, FL11:248,11pb, FL11:203,80pb, FL11:146,80pb*
L.a GII	*Alb09-Alb10*	260	0,0009833	23	*F2:347,24pb, F2:212,46pb, FL1:572,91pb, FL1:563,51pb, FL1:255,34pb, FL1:247,90pb, FL1:229,23pb, FL1:185,93pb, FL1:164,33pb, FL2:391,30pb, FL3:138,89pb, FL3:129,32pb, FL4:801,13pb, FL4:407,78pb, FL4:160,16pb, FL5:346,45pb, FL7:467,24pb, FL8:755,15pb, FL8:511,43pb, FL8:486,11pb, FL8:207,85pb, FL11:416,72pb, FL11:122,63pb*
L.a GIII	*Alb01-Alb02-Alb03-Alb04*	551	0,00208204	47	*F1 841,45pb, F1 369,82pb, F1 209,43pb, F2:2110pb, F2:1453pb, F2:1109pb, F2:255,40pb, F2:188,50pb, F3:1276pb, F3:1039pb, F4:638,41pb, F4:584,32pb, F4:284,84pb, FL1:445,97pb, FL1:141,61pb, FL2:133,17pb, FL3:846,06pb, FL3:776,31pb, FL3:550,44pb, FL3:182,30pb, FL3:165,14pb, FL4:616,55pb, FL4:452,58pb, FL4:363,03pb, FL4:280,06pb, FL4:132,15pb, FL4:112,34pb, FL5:315,90pb, FL5:206,83pb, FL6:908pb, FL6:901pb, FL6:535,73pb, FL7:1230pb, FL7:866,64pb, FL7:568,35pb, FL7:489,34pb, FL7:377,71pb, FL7:320,30pb, FL7:220,10pb, FL8:1221pb, FL8:261,99pb, FL10:1439pb, FL10:917pb, FL10:714,70pb, FL10:577,50pb, FL11:909pb, FL11:502,95pb*

II-2-2-1 b Classification hiérarchique

Les pourcentages de similarité de Dice calculés entre les différentes accessions de *L. albus* ont été utilisés pour réaliser une classification hiérarchique en UPGMA (Figure II.12).

La classification probable des 10 accessions de *L. albus* montre le regroupement de ces accessions à un pourcentage de similarité de 75% en trois groupes distincts: **le groupe *L.aGI*** formé de quatre accessions géographiquement éloignées; Alb05 (Douar beni moussa, Alb06 et Alb07 (Meknès) et Alb08 (El jadida), l**e groupe *L.aGII***, avec les deux accessions de Marrakech Alb09 et Alb10, l**e troisième groupe, *L.aGIII*** est défini par quatre accessions, une de Benslimane (Alb01), deux de Bousnika (Alb02 et Alb03) et une de Souk larbaa (Alb01).

A un degré de similarité plus élevé (77%), on peut définir deux sous-groupes au sein du groupe *L.aGI*. Le sous-groupe Alb05/Alb06 et le sous-groupe Alb07/Alb08.

D'un autre côté, chacun des trois groupes a permis de générer un nombre de fragments ISSR variable. Le groupe *L.aGI* a généré le nombre le plus élevé de bandes avec 554. Le groupe *L.aGIII* a révélé 551 bandes ISSR. Le groupe *L.aGII* montre le nombre le plus faible de fragments avec 260. La variabilité des trois groupes déduite par le nombre de bandes ISSR obtenues est aussi appuyée par la moyenne de diversité de chaque groupe (Tableau II.15).

Des 1365 fragments ISSR obtenus, 110 (8,05%) ont été spécifiques (Tableau II.15). 40 marqueurs spécifiques pour le groupe *L.aGI*, 23 pour le groupe *L.aGII* et 47 du groupe *L.aGIII*.

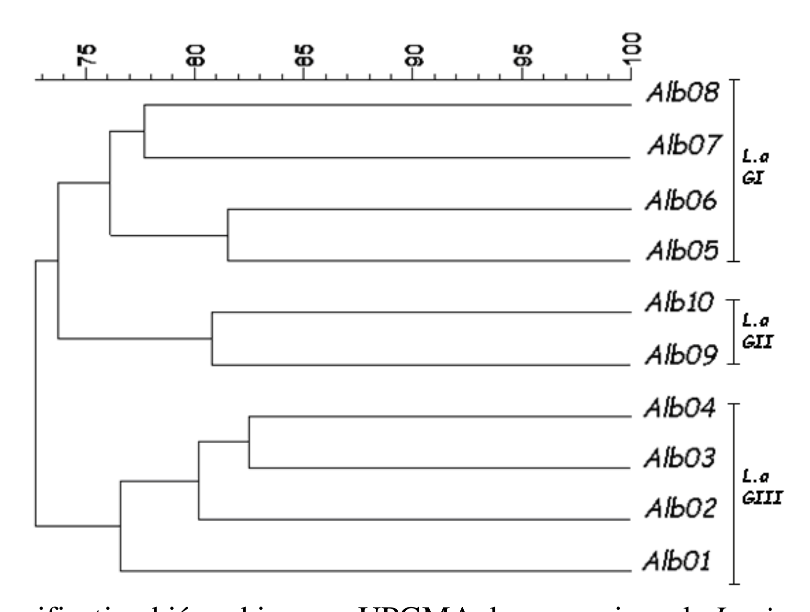


Figure II.12: Classification hiérarchique en UPGMA des accessions de *Lupinus albus*.
L.a GI : *L. albus* groupe I. *L.a GII* : *L. albus* groupe II. *L.a GIII* : *L. albus* groupe III

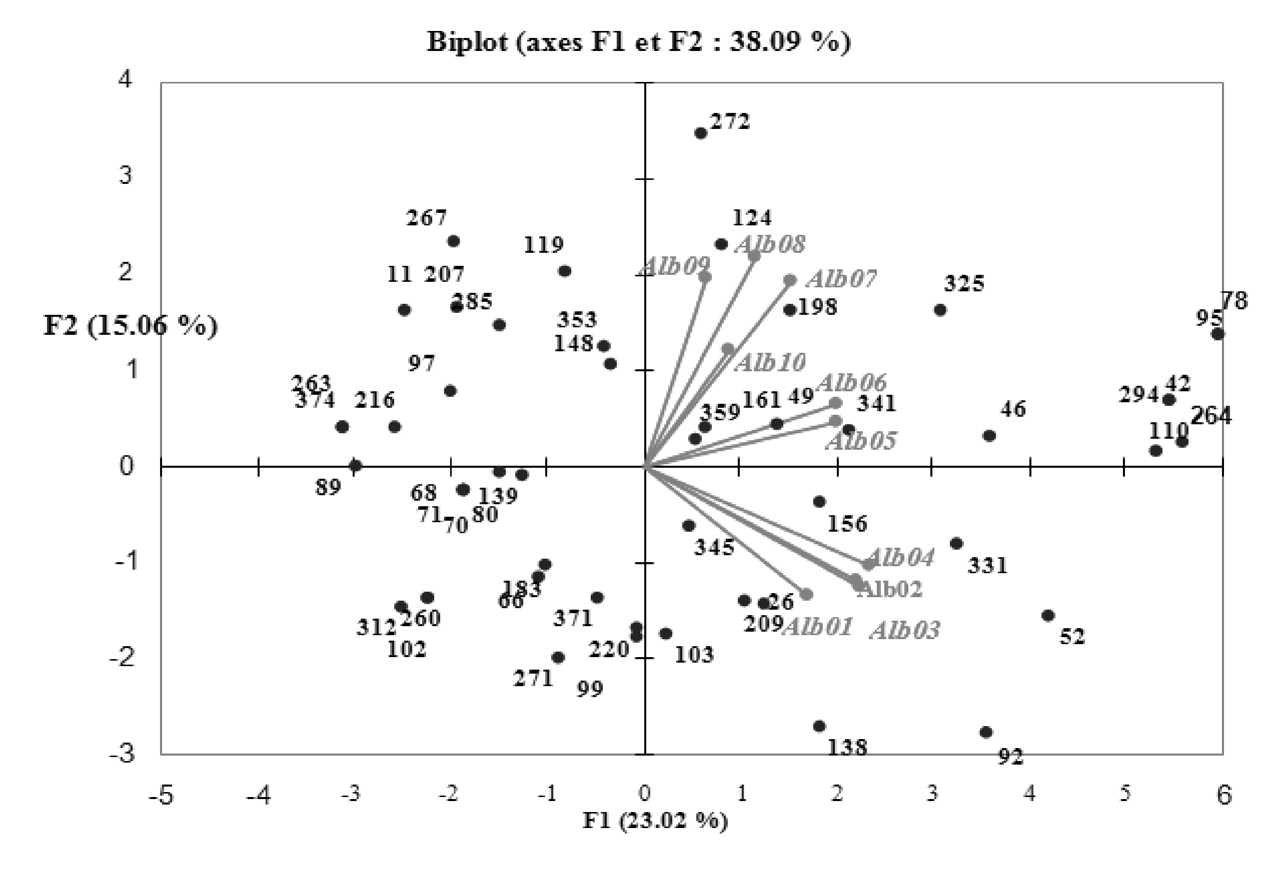


Figure II.13: Analyse factorielle ACP des populations de *L. albus* sur la base des marqueurs ISSR.

11*: F1 503,34pb,* ***26****: F1 188,77pb*
39*: F2:738,41pb,* ***42****: F2:567,25pb,* ***46****: F2:448,75pb,* ***49****: F2:365,75pb,* ***52****: F2:333,37pb,* ***66****: F2:137,65pb,*
68*: F3:1164pb, 70:* ***F3****:872,30pb,* ***78****: F3:478,86pb,* ***80****: F3:403,34pb,* ***89****:F3:226,10pb*
92*: F4:2928pb,* ***95****: F4:1057pb,* ***97****: F4:867,12pb,* ***99****: F4:660,93pb,* ***102****: F4:584,32pb,* ***103****: F4:516,78pb,* ***110****: F4:325,34pb*
119*: FL1:770,80pb,* ***124****: FL1:581,54pb,* ***148****: FL1:127,09pb*
156*: FL2:254,50pb,* ***161****: FL2:137,90pb*
183*: FL3:370,25pb,* ***198****: FL3:151,62pb*
207*: FL4:548,49pb,* ***209****: FL4:467,29pb,* ***216****: FL4:302,73pb,* ***220****: FL4:218,83pb,*
246*: FL6:486,90pb*
260*: FL7:568,35pb,* ***263****: FL7:467,24pb,* ***267****: FL7:349,68pb,* ***271****: FL7:220,10pb,* ***272****: FL7:192,66pb,*
285*: FL8:680,57pb,* ***294****:FL8:336,81pb*
312*: FL10:917pb,* ***325****: FL10:426,62pb,* ***331****: FL10:327,61pb,* ***341****: FL10:197,12pb,*
345*: FL11:1645pb,* ***353****: FL11:599,16pb,* ***359****: FL11:394,95pb,* ***371****: FL11:185,05pb,* ***374****: FL11:122,63pb.*

II-2-2-1 c Analyse en composantes principales

Une autre représentation bidimensionnelle ou analyse en composantes principales ACP a été réalisée sur la base des marqueurs ISSR (Figure II.13). Cette représentation en nuage de points nous permet d'avoir une autre vision sur la structuration des 10 accessions d'*albus*. Ceci est appuyé par la contribution de 48 marqueurs ISSR. La représentation ACP a été réalisée selon les premiers axes F1 et F2, ceux-ci ont apporté le maximum d'information avec 38,09% de variabilité (Tableau II.16).

La contribution de chacun des marqueurs ISSR dans la structuration des populations d'*albus* a été résumée dans l'annexe II.4.

A première vue, on retrouve le même regroupement probable des accessions proposé par la classification en UPGMA. On note aussi que l'ensemble des accessions est groupé dans un même niveau, précisément au niveau de la partie positive de l'axe F1 et des deux côtés positifs et négatifs de l'axe F2. Seules les accessions du groupe *L.aGIII* (Alb01-04) ont été positionnées au niveau de la partie négative de l'axe F2.

Tableau II.16. Valeur propre, variabilité et pourcentage cumulé des deux premiers axes de l'ACP basée sur les marqueurs ISSR.

	F1	F2
Valeur propre	2,303	1,515
Variabilité (%)	20,934	13,776
% cumulé	20,934	34,710

II-2-2-1 d Distribution tridimensionnelle

Une distribution tridimensionnelle *ou* ``Multidimensionnal scaling *MDS''* a été effectuée afin d'avoir une idée sur la structuration tridimensionnelle des 10 accessions d'*albus* (Figure II.14). Cette représentation permet de voir la distribution des différentes accessions selon trois axes X, Y et Z sur la base de leurs distances génétiques.

On retrouve clairement les trois regroupements d'accessions *L.aGI, L.aGII* et *L.aGIII* proposés précédemment (Figure II.13). Dans la figure II.14 les trois groupes ont été délimités par des ellipses très éloignées l'une de l'autre et ne présentent aucun chevauchement. Ceci suppose qu'il n'y a pas d'échange entre les accessions des trois groupes.

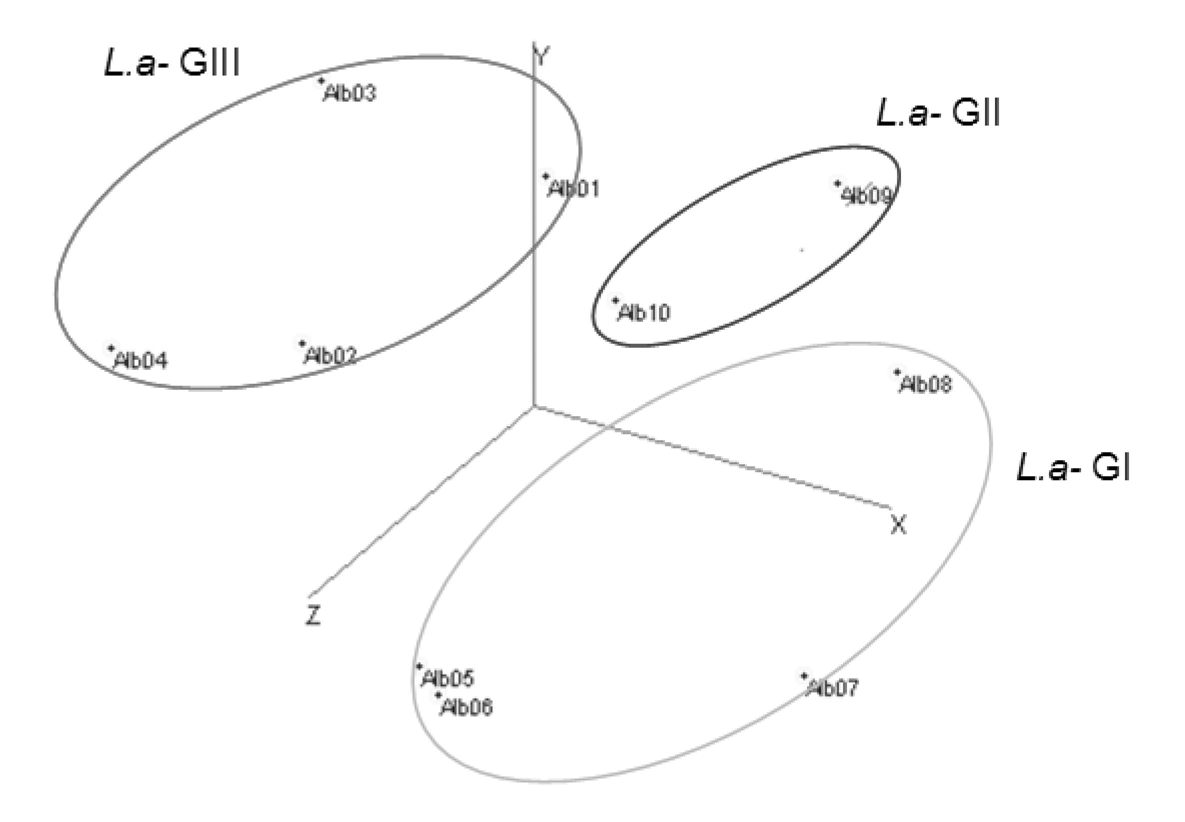


Figure II.14. Distribution spatiale tridimensionnelle (MDS) représentant les accessions de *L. albus* moyennant les marqueurs ISSR.

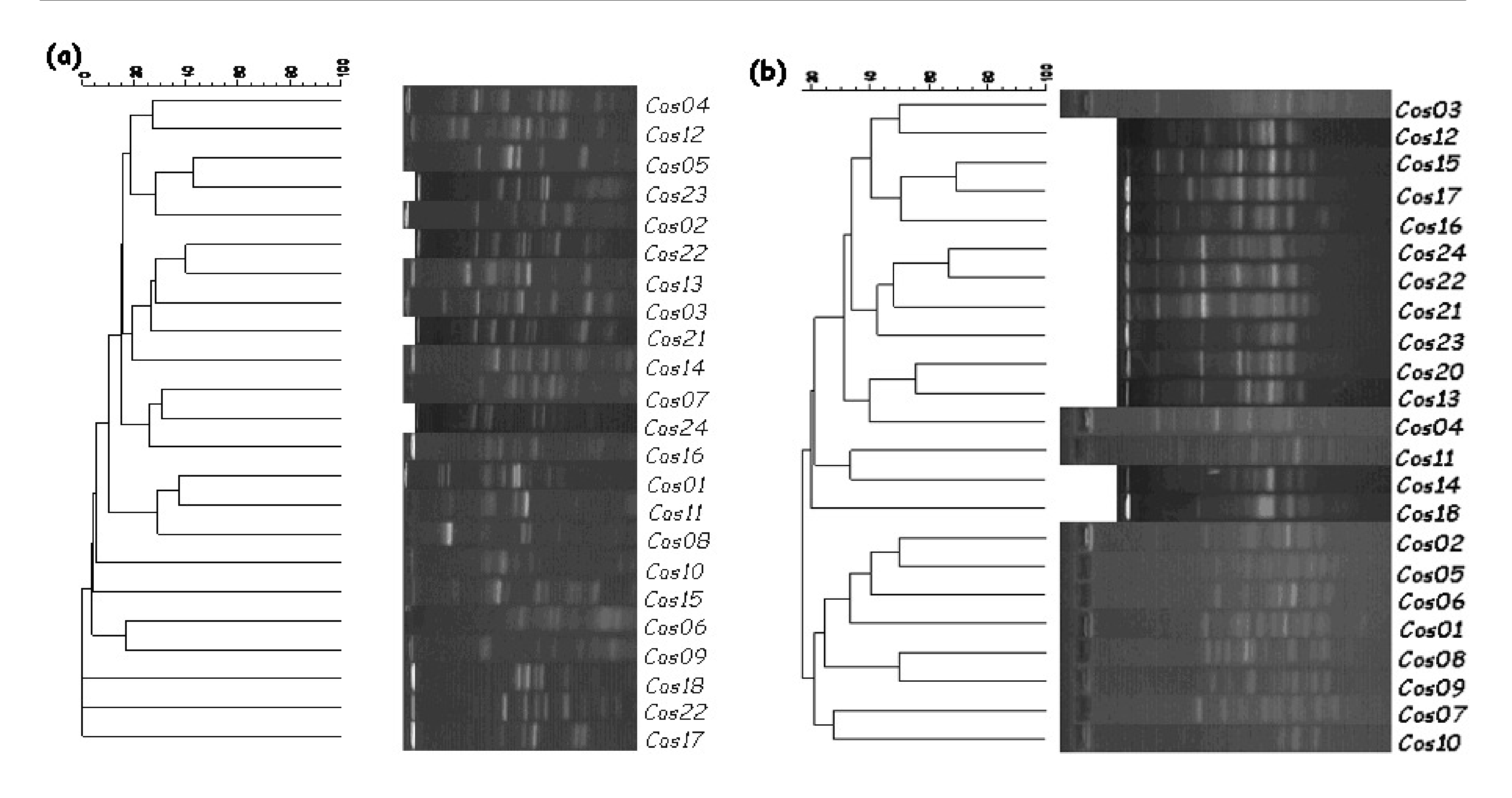


Figure II.15. Profils électrophorétiques ISSR obtenus pour les accessions de *L. cosentinii* moyennant l'amorce F1 (a) et F3 (b) et les classifications hiérarchiques en UPGMA correspondantes.

II-2-2-2 Chez *Lupinus cosentini*

L'étude intra-spécifique de *L. cosentinii* sur la base des marqueurs ISSR a porté sur les 23 différentes accessions. L'échantillonnage de *cosentinii* a couvert une zone entre Kénitra et Mohammedia. 15 amorces ISSR ont permis de générer des profils électrophorétiques nets (Figure II.15) et ont donc été maintenues dans cette étude.

Un total de 547 bandes ISSR a été obtenu avec une moyenne de 36,4 bandes par amorce (Tableau II.17). En fait, le nombre de fragments générés a été variable d'une amorce à une autre et allait de 25 (FL11) à 51 (FL1). Le nombre de bandes générées était aussi variable selon les accessions (Tableau II.18). Le poids moléculaire de ces bandes était très variable, entre 99,88 et 1826 pb. Les marqueurs ISSR utilisés ont révélé un pourcentage de polymorphisme très élevé de 100% confirmé par un indice de diversité proche de 1. En effet, les valeurs de PIC variaient entre 0,94 et 0,97 avec une moyenne de 0,956 et un écart-type de 0,0073. Sur la base des marqueurs ISSR obtenus les 23 accessions analysées ont présenté plusieurs fragments en communs. Néanmoins, à l'exception de l'accession Cos03, toutes les autres accessions ont été caractérisées par au moins un marqueur spécifique. Le nombre des marqueurs spécifiques a été variable d'une accession à une autre et allait de 1 (Cos15, Cos02, Cos04 et Cos22) à 7 (Cos09) (Tableau II.19).

Tableau II.17. Marqueurs obtenus pour les 23 accessions de *L. cosentinii* étudiés par les 15 amorces ISSR.

Amorce	Marqueurs générés	Taille des bandes obtenues (pb)	Marqueurs polymorphes	PIC
F1	34	975-138,46	34	0,95
F2	34	821,72-115,16	34	0,95
F3	31	1111-164,83	31	0,95
F4	44	2164-174,46	44	0,97
FL1	51	1482-115,53	51	0,96
FL2	40	1696-111,14	40	0,96
FL3	43	1773-125,37	43	0,96
FL4	26	639,53-99,88	26	0,94
FL5	40	800,32-116,26	40	0,96
FL6	35	896,37-110,00	35	0,96
FL7	42	1826-108,33	42	0,96
FL8	32	1228-144,11	32	0,95
FL9	36	1095-100,17	36	0,96
FL10	34	1183-150,50	34	0,96
FL11	25	598,19-136,29	25	0,95
Total	**547**	**99,88 -1826**	**547**	**0,956±0,0073**

Tableau II. 18: Marqueurs ISSR générés pour les accessions de *L. cosentinii* et par amorce.

Amorce ISSR	**Nombre de marqueurs générés**																						
	Cos 10	***Cos 15***	***Cos 16***	***Cos 17***	***Cos 03***	***Cos 21***	***Cos 07***	***Cos 02***	***Cos 05***	***Cos 23***	***Cos 18***	***Cos 20***	***Cos 12***	***Cos 04***	***Cos 24***	***Cos 22***	***Cos 13***	***Cos 14***	***Cos 08***	***Cos 11***	***Cos 01***	***Cos 06***	***Cos 09***
F1	1	6	4	0	6	7	7	4	5	5	0	0	8	7	10	9	6	9	3	4	4	5	3
F2	3	7	7	6	3	10	7	8	8	7	5	11	9	8	8	10	7	5	6	15	9	6	5
F3	5	12	10	10	8	11	9	10	8	5	6	8	7	9	8	7	6	7	8	9	12	7	7
F4	17	14	10	13	11	12	5	12	8	13	7	12	14	10	11	15	17	14	7	16	13	6	14
FL1	8	7	2	7	7	19	10	8	9	16	10	16	9	8	18	15	3	8	10	8	10	9	9
FL2	9	13	5	4	9	10	7	7	7	12	3	11	3	14	7	8	7	4	15	4	12	5	7
FL3	6	13	6	6	7	12	7	10	10	10	6	17	8	14	13	12	7	8	12	12	12	11	9
FL4	5	4	4	4	6	3	4	6	7	5	4	5	5	6	5	6	4	4	6	5	7	5	9
FL5	5	7	7	6	8	11	9	10	8	9	9	12	7	10	14	12	8	8	8	6	10	8	6
FL6	6	4	12	9	9	8	9	10	11	9	8	8	6	8	7	7	5	10	9	8	12	13	8
FL7	9	7	10	6	7	7	10	8	6	9	10	11	5	8	7	9	9	4	6	2	7	8	5
FL8	7	14	12	8	12	13	9	6	14	9	13	10	9	13	8	10	6	13	10	7	12	11	9
FL9	11	10	10	9	12	12	11	11	11	10	8	10	11	9	11	10	9	8	14	12	11	9	12
FL10	10	11	8	8	9	6	10	11	6	8	7	6	7	7	7	8	10	9	11	12	8	8	11
FL11	7	7	8	8	10	8	7	9	9	7	7	6	7	9	6	7	9	7	8	7	8	9	8

Tableau II.19. Marqueurs ISSR spécifiques aux différentes accessions de *L. cosentinii*

Accession	Marqueurs spécifiques
Cos10	*F4:1477pb, FL7:1826pb, FL7:994pb*
Cos15	*FL2:397,32pb*
Cos16	*FL7:436,38pb*
Cos17	*F4:203,16pb, FL5:181,68pb, FL6:723,33pb, FL9:890,60pb*
Cos03	*0*
Cos21	*FL7:108,33pb, FL9:670,38pb*
Cos07	*F2:236,67pb, F3:164,83pb, FL9:100,17pb, FL10:1057pb*
Cos02	*FL9:622,29pb*
Cos05	*FL1:565,82pb*
Cos23	*F1:329,49pb, FL1:851,80pb*
Cos18	*FL1:473,97pb, FL5:218,77pb, FL5:141,29pb*
Cos22	*FL2:1696pb, FL2:1241pb, FL3:1773pb, FL5:561,31pb, FL5:309,61pb, FL7:1357pb*
Cos12	*FL6:896,37pb, FL6:812,31pb, FL7:1181pb*
Cos04	*F1:543,62pb*
Cos24	*F1:192,00pb, FL1:1325pb, FL1:1123pb, FL3:1332pb, FL3:125,37pb*
Cos22	*FL1:1482pb*
Cos13	*FL2:628,48pb*
Cos14	*F1:138,46pb, FL6:364,59pb, FL8:941pb, FL10:1183pb*
Cos08	*F2:120,52pb, FL10:932pb*
Cos11	*F2:196,15pb, FL4:133,66pb, FL7:827,16pb, FL8:144,11pb*
Cos01	*F4:174,46pb, FL4:361,21pb, FL6:630,83pb*
Cos06	*F1:172,44pb, FL2:111,14pb*
Cos09	*F4:2164pb, F4:1727pb, F4:1264pb, FL1:115,53pb, FL4:639,53pb, FL4:560,57pb, FL4:436,92pb*

Tableau II.20. Matrice de similarité de Dice entre les 22 accessions de *L. cosentinii* sur la base des marqueurs ISSR.

Cos16	100,00																						
Cos15	51,80	100,00																					
Cos17	50,01	47,35	100,00																				
Cos18	42,93	34,98	47,37	100,00																			
Cos19	34,35	40,59	40,17	46,88	100,00																		
Cos23	38,15	42,11	38,54	42,98	53,70	100,00																	
Cos20	42,93	35,01	35,75	37,91	53,48	48,20	100,00																
Cos22	34,29	32,33	40,01	35,99	49,32	50,01	49,30	100,00															
Cos21	30,65	35,61	37,35	38,91	54,55	46,65	48,45	*55,11*	100,00														
Cos10	35,35	44,04	30,28	35,23	32,24	38,10	30,26	27,79	32,37	100,00													
Cos09	38,10	34,01	33,34	28,38	31,77	32,66	31,49	37,11	34,51	48,35	100,00												
Cos08	39,83	48,54	38,57	36,19	38,32	42,21	30,59	37,51	34,23	44,73	49,19	100,00											
Cos11	33,06	41,81	29,83	24,87	35,12	36,45	32,78	35,39	29,71	47,85	45,94	*57,02*	100,00										
Cos07	34,71	32,21	37,15	40,63	39,15	36,03	36,21	42,51	35,75	45,51	46,73	50,41	47,12	100,00									
Cos12	34,45	42,80	33,93	36,15	31,95	28,92	27,37	33,61	30,59	40,19	37,21	46,02	47,87	40,01	100,00								
Cos14	37,94	46,92	44,98	36,37	37,16	33,34	34,11	37,10	34,62	42,86	39,22	43,37	43,70	41,45	42,16	100,00							
Cos13	40,93	41,67	34,91	28,11	32,19	31,71	27,78	37,19	29,03	37,45	40,43	40,36	40,80	37,63	40,56	44,16	100,00						
Cos02	33,34	31,67	31,78	34,45	34,54	40,17	42,11	37,96	38,44	39,18	36,89	39,85	40,18	42,01	37,62	36,04	30,46	100,00					
Cos01	36,69	36,52	32,76	29,58	34,35	38,14	36,37	38,65	41,03	37,01	32,93	40,31	40,49	29,85	34,88	40,36	32,77	*56,43*	100,00				
Cos03	38,24	43,13	31,89	30,85	37,41	39,14	36,69	38,50	36,37	37,51	36,28	41,39	41,55	43,64	42,11	44,34	35,24	55,78	44,45	100,00			
Cos06	37,15	44,92	45,06	45,75	37,61	35,91	31,41	38,60	37,23	41,77	43,64	44,83	40,75	47,79	38,55	39,62	42,70	43,95	40,17	44,25	100,00		
Cos05	38,39	38,18	36,29	35,79	36,37	38,34	40,35	36,17	37,87	34,93	42,01	41,23	38,27	48,38	39,24	43,05	38,24	45,74	40,91	52,21	61,07	100,00	
Cos04	28,45	36,60	33,50	40,57	44,53	34,79	40,93	45,91	43,78	40,01	46,52	48,17	34,51	46,96	38,15	38,47	35,01	42,39	42,49	52,51	*57,86*	51,13	100,00

II-2-2-2 a Distances génétiques

La comparaison des 23 accessions de *cosentinii* a été réalisée sur la base des marqueurs ISSR et en utilisant l'indice de Dice. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentages de similarités dans le tableau II.20.

On remarque que les pourcentages de similarité étaient très variables et fluctuaient entre 24,87 et 61,07%. La similarité la plus faible (24,87%) a été notée entre deux accessions géographiquement éloignées Cos18 (hay Menzah-Rabat) et Cos11 (route de Souk larbaa vers Kénitra). Par contre la similarité la plus importante a été enregistrée pour deux accessions de la même région, Rabat-Kénitra (Cos05 et Cos06).

II-2-2-2 b Classification hiérarchique

Les résultats obtenus par comparaison des différentes accessions moyennant l'indice de Dice ont été utilisés pour réaliser un dendrogramme de classification hiérarchique en UPGMA (Figure II.16).

A un pourcentage de similarité de 42%, on peut subdiviser le dendrogramme en cinq groupes :

Le groupe L.c GI-1, représentant la région de Témara –Rabat/hay Menzeh.

Le groupe L.c GI-2, représentant la zone allant de hay Menzeh vers Mohammedia.

Le groupe L.c GII-1, regroupant des populations originaires de la région entre Rabat et Kénitra (Cos07 et Cos08), de Kénitra (Cos09, Cos10 et Cos11) et une population de Témara (Cos12).

Le groupe L.c GII-2, avec deux populations peu éloignées géographiquement. Une population de Témara (Cos13) et une population de Rabat (Cos14).

Le groupe L.c GII-3, qui regroupe cinq populations de la région de Rabat (Cos01, Cos02, Cos03, Cos04 et Cos05) et une population de Kénitra (Cos06).

A un pourcentage de similarité plus faible (38%), on définit deux clusters bien distincts L.c GI et L.c GII.

Le cluster I, regroupe en plus de l'accession Cos15 de Kenitra, les accessions appartenant à la région allant de Rabat- hay Menzeh vers Mohammedia (Cos16, Cos17, Cos18, Cos19, Cos20, Cos21, Cos22 et Cos23).

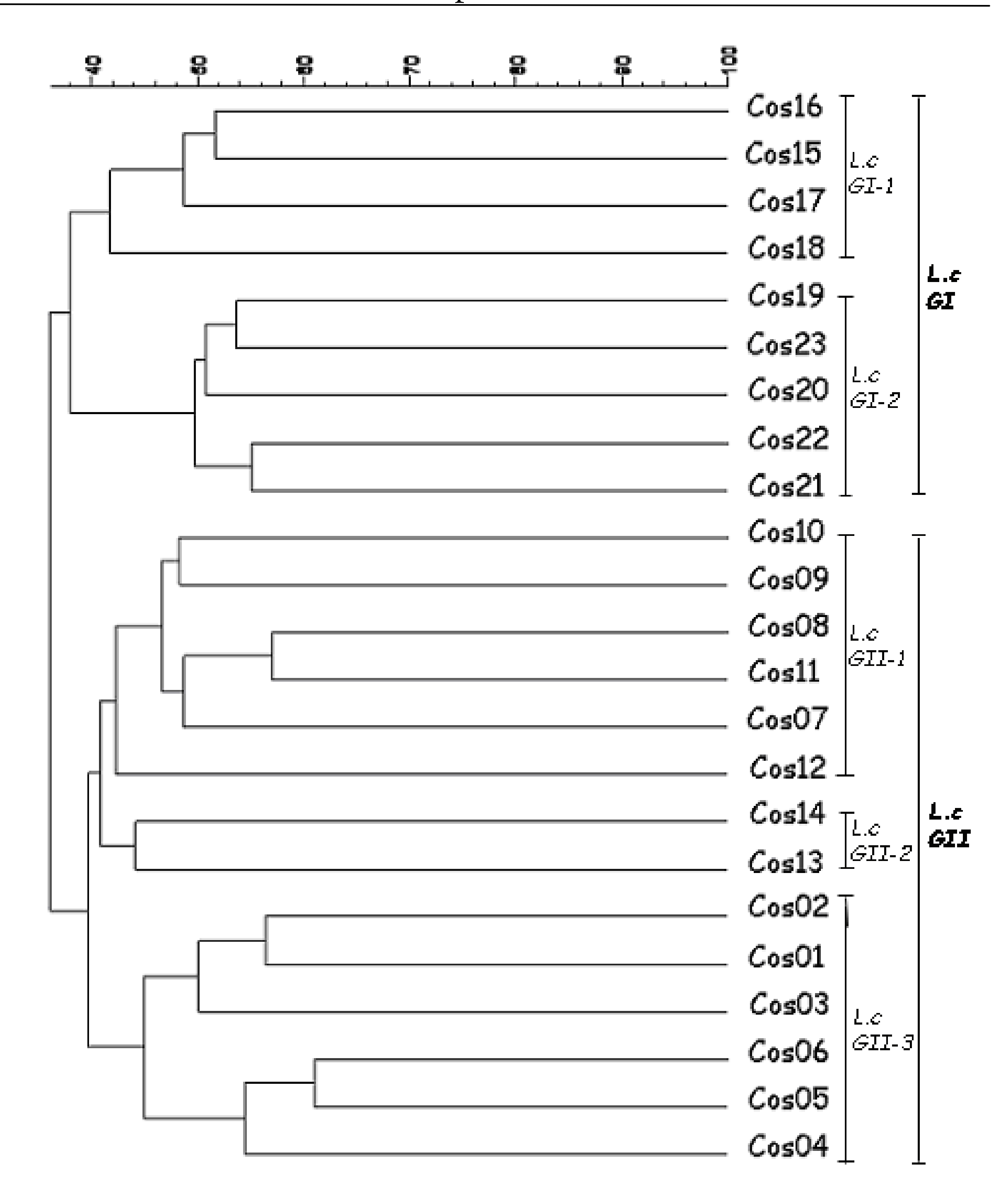


Figure II.16. Dendrogramme obtenu avec le coefficient de Dice sur la base des résultats ISSR obtenu pour les 22 accessions de *L. cosentinii*.

Le cluster II, comprend des accessions en provenance de la zone Témara- ceinture verte vers Kenitra (Cos01-Cos11 et Cos14). On a aussi deux accessions qui sortent de cette ligne d'échantillonnage, Cos12 et Cos13.
On remarque le chevauchement des deux groupes au niveau des accessions appartenant à la région de Témara- hay Menzeh. Ceci, pourrait supposer que cette zone est un lieu d'échange et de flux génique entre les deux zones I et II.

Les cinq groupes définis (L.c GI-1, L.c GI-2, L.c GII-1, L.c GII-2 et L.c GII-3) ont été caractérisés par plusieurs marqueurs ISSR en commun. Par ailleurs, un certain nombre de marqueurs ISSR uniques ont été enregistrés (Tableau II.21). Le nombre de marqueurs uniques variait entre 226 pour L.c GII-2 et 782 pour L.c GII-3 (Tableau II.21).

Le degré de diversité de chacun des cinq sous-groupes a été évalué moyennant l'indice de diversité de Nei. Le sous-groupe L.c GII-1 représentant les populations de la région de Kénitra et de Rabat montre le plus diversité. Par contre, le sous-groupe L.c GII-2 est défini par deux populations peu éloignées géographiquement. Une population originaire de Rabat Cos14 et une de Témara Cos13, présentent le degré de diversité le plus faible (0,036).

II-2-2-2 c Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales ACP des 23 populations de *Cosentinii* a été élaborée sur la base des marqueurs ISSR (Figure II.17). L'ACP a été réalisée selon les deux axes F1 et F2 apportant 20,59% de variabilité (Tableau II.22).
On remarque que les 23 populations sont groupées au niveau de la moitié positive de l'axe F1.
La structuration a été appuyée par plusieurs ISSR. L'apport et la contribution de chaque ISSR ont été résumés au niveau de l'annexe II.5.

Tableau II. 21: Marqueurs ISSR spécifiques pour chaque groupe de *L. cosentinii*

Groupes	Accessions	marqueurs	Diversité	Marqueurs spécifiques
L.c GI-1	*Cos15- Cos16- Cos17 – Cos18*	451	0,0037001	***F4***:*203,16pb,* ***FL1***:*473,97pb,* ***FL2***:*397,32pb,* ***FL5***:*218,77pb,* ***FL5***:*181,68pb,* ***FL5***:*141,29pb,* ***FL5***:*183,26pb,* ***FL5***:*116,26pb,* ***FL6***:*723,33pb,* ***FL7***:*438,67pb,* ***FL7***:*436,38pb,* ***FL8***:*709,85pb,* ***FL9***:*890,60pb*
L.c GI-2	*Cos19 –Cos20 – Cos21 –Cos22 – Cos23*	705	0,0037034	***F1***:*329,49pb,* ***F1***:*192,00pb,* ***FL1***:*1482pb,* ***FL1***:*1325pb,* ***FL1***:*1123pb,* ***FL1***:*1067pb,* ***FL1***:*1060pb,* ***FL1***:*851,80pb,* ***FL1***:*804,60pb,* ***FL1***:*584,66pb,* ***FL1***:*374,88pb,* ***FL3***:*1773pb,* ***FL3***:*1332pb,* ***FL3***:*125,37pb,* ***FL5***:*561,31pb,* ***FL5***:*309,61pb,* ***FL5***:*343,22pb,* ***FL5***:*322,63pb,* ***FL5***:*475,48pb,* ***FL5***:*800,32pb,* ***FL7***:*1357pb,* ***FL7***:*108,33pb,* ***FL9***:*670,38pb,* ***FL11***:*153,84pb*
L.c GII-1	*Cos07 – Cos08 – Cos09 – Cos10 – Cos11 – Cos12*	724	0,0037035	***F1***:*975pb,* ***F2***:*236,67pb,* ***F2***:*196,15pb,* ***F2***:*120,52pb,* ***F2***:*384,12pb,* ***F2***:*395,35pb,* ***F3***:*164,83pb,* ***F4***:*2164pb,* ***F4***:*1727pb,* ***F4***:*1477pb,* ***F4***:*1264pb,* ***FL4***:*639,53pb,* ***FL4***:*560,57pb,* ***FL4***:*436,92pb,* ***FL6***:*896,37pb,* ***FL6***:*812,31pb,* ***FL4***:*380,25pb,* ***FL7***:*1826pb,* ***FL7***:*1181pb,* ***FL7***:*994pb,* ***FL7***:*827,16pb,* ***FL7***:*387,29pb,* ***FL7***:*273,48pb,* ***FL8***:*144,11pb,* ***FL9***:*477,93pb,* ***FL9***:*100,17pb,* ***FL10***:*1057pb,* ***FL10***:*932pb*
L.c GII-2	*Cos13 – Cos14*	226	0,00369	***F1***:*138,46pb,* ***F4***:*1354pb,* ***FL8***:*941pb,* ***FL10***:*1183pb*
L.c GII-3	*Cos01 – Cos02 – Cos03 – Cos04 – Cos05 – Cos06*	782	0,0037033	***F1***:*543,62pb,* ***F1***:*172,44pb,* ***F2***:*146,45pb,* ***F3***:*1111pb,* ***F4***:*179,20pb,* ***F4***:*174,46pb,* ***FL1***:*168,33pb,* ***FL1***:*565,82pb,* ***FL2***:*111,14pb,* ***FL6***:*630,83pb,* ***FL4***:*361,21pb,* ***FL7***:*465,85pb,* ***FL9***:*622,29pb,* ***FL11***:*136,29pb*

Tableau II. 22. Information et variabilité des deux axes F1 et F2

	F1	F2
Valeur propre	1,671	1,360
Variabilité (%)	20,891	16,994
% cumulé	20,891	37,886

On remarque qu'en limitant la représentation ACP aux marqueurs ISSR uniques, les 23 populations de *Cosentinii* sont regroupées en trois groupes distincts:

Le groupe 1 avec une population de Rabat (Cos20) dont la représentation est appuyé par quatre marqueurs ISSR spécifiques.

Le groupe 2 avec une population de Kénitra (Cos09) et les six marqueurs uniques contribuant à sa distribution.

Le groupe 3 regroupant le reste des populations de Cosentinii et les marqueurs ISSR uniques appuyant leurs représentations.

II-2-2-2 d Représentation tridimensionnelle

Dans le but d'avoir une autre vision sur la structuration des 23 populations de *Cosentinii*, une représentation tridimensionnelle ou multidimensional scaling MDS a été réalisée (Figure II.18). La représentation basée sur les données ISSR et les distances génétiques calculées est représentée selon les axes X, Y et Z.

On note que les 23 populations de *Cosentinii* sont dispersées sur l'ensemble des plans. Par ailleurs, on arrive à retrouver le regroupement potentiel des populations prédéfini dans la représentation en UPGMA.

Les différents groupes ont été délimités par des ellipses. Trois groupes (L.c GII-1, L.c GI-2 et L.c GII-3) représentant les populations de Kénitra et de Rabat et une population de Mohammedia sont inter croisés.

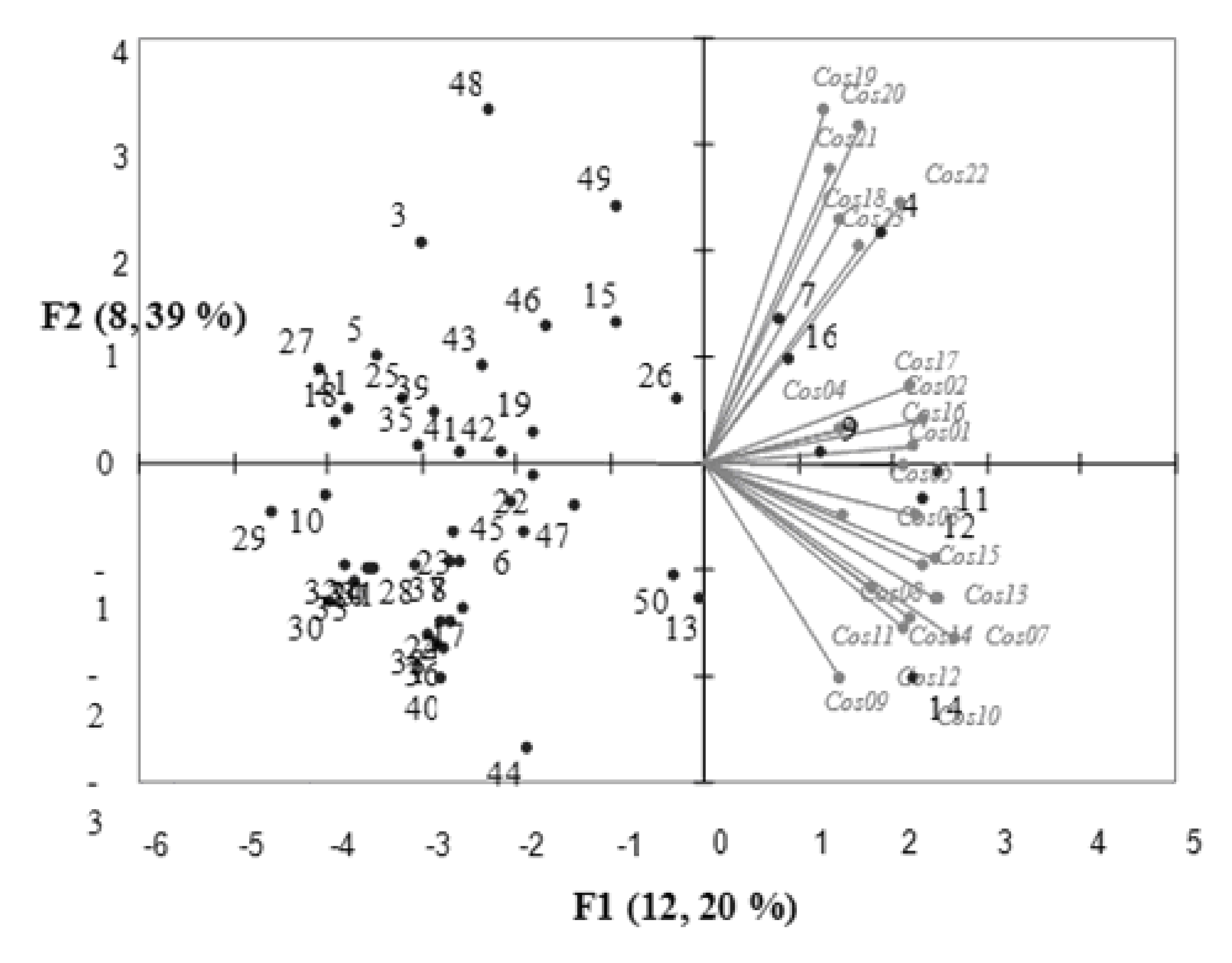


Figure II.17: Analyse en composantes principales des 23 accessions de *L. cosentinii* avec les 48 marqueurs ISSR appuyant cette structuration.

1: *F1:975pb,* **2:** *F1:883,17pb,* **3:** *F1:819,28pb,* **4:** *F1:749,01,* **5:** *F1:649,88,* **6:** *F1:632,07pb,* **7:** *F1:613,78pb,* **8:** *F1:580,79pb,* **9:** *F1:558,19pb,* **10:** *F1:543,62pb,* **11:** *F1:517,17pb,* **12:** *F1:487,94pb,* **13:** *F1:463,73pb,* **14:** *F1:432,10pb,* **15:** *F1:389,85pb,* **16:** *F1:348,10pb,* **17:** *F1:334,13pb,* **18:** *F1:329,49pb,* **19:** *F1:301,07pb,* **20:** *F1:283,24pb***,** **21:** *F1:282,73pb,* **22:** *F1:270,43pb,* **23:** *F1:244,86pb,* **24:** *F1:228,44pb,* **25:** *F1:213,70pb,* **26:** *F1:199,67pb,* **27:** *F1:192,00pb,* **28:** *F1:181,48pb,* **29:** *F1:172,44pb,* **30:** *F1:155,40pb,* **32:** *F2:236,67pb,* **33:** *F2:196,15pb,* **34:** *F2:120,52pb,* **35:** *F2:682,50pb,* **36:** *F2:384,12pb,* **37:** *F2:382,43pb,* **39:** *F2:132,44pb,* **40:** *F2:115,16pb,* **41:** *F2:745,65pb,* **42:** *F2:736,15pb,* **43:** *F2:593,69pb,* **45:** *F2:146,45pb,* **46:** *F2:480,20pb,* **47:** *F2:307,46pb,* **48:** *F2:136,56pb,* **49:** *F2:774,26pb,* **50:** *F2:570,92pb.*

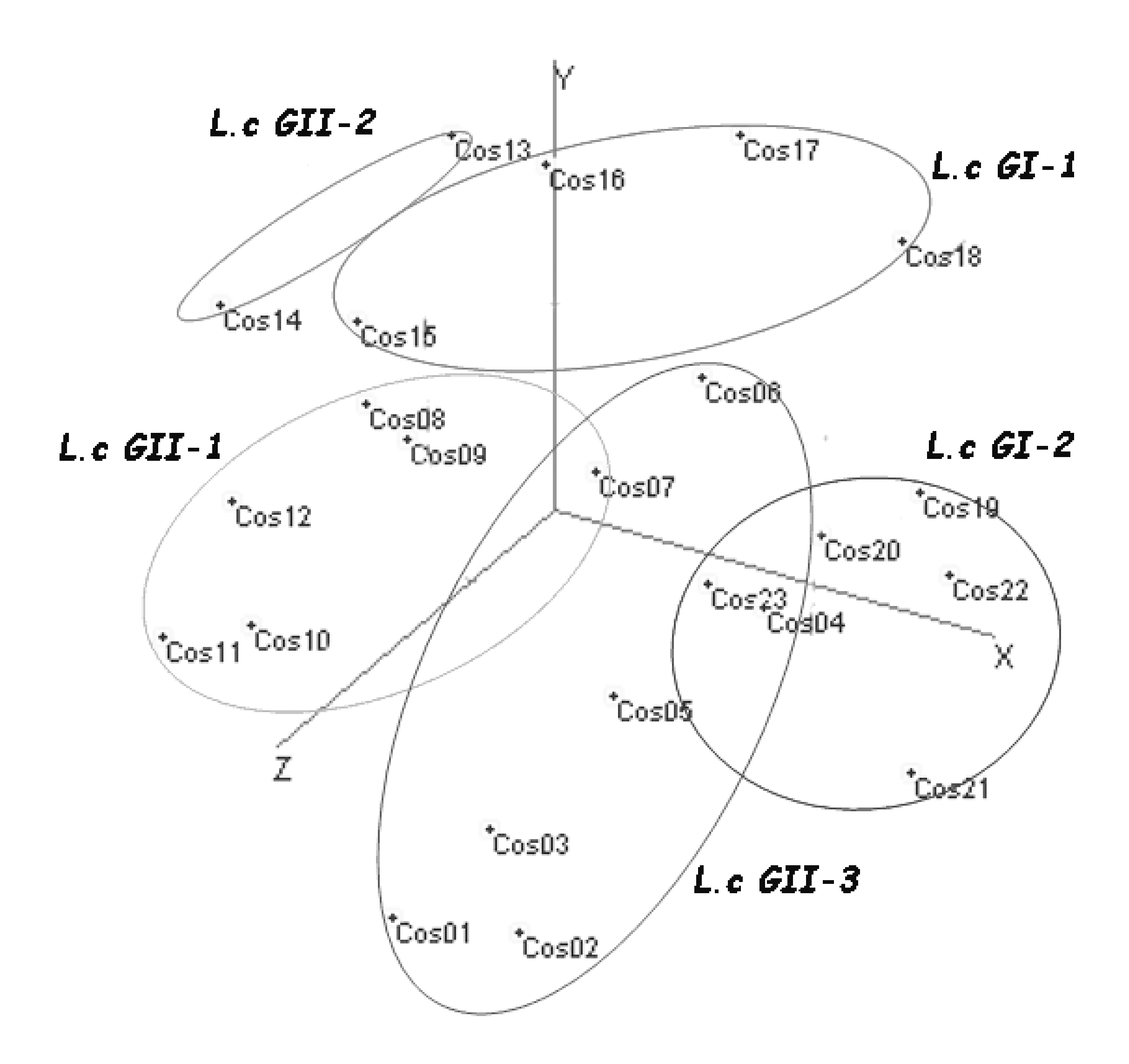


Figure II.18. Représentation tridimensionnelle de type MDS représentant les accessions de *L. cosentinii* sur la base des marqueurs ISSR

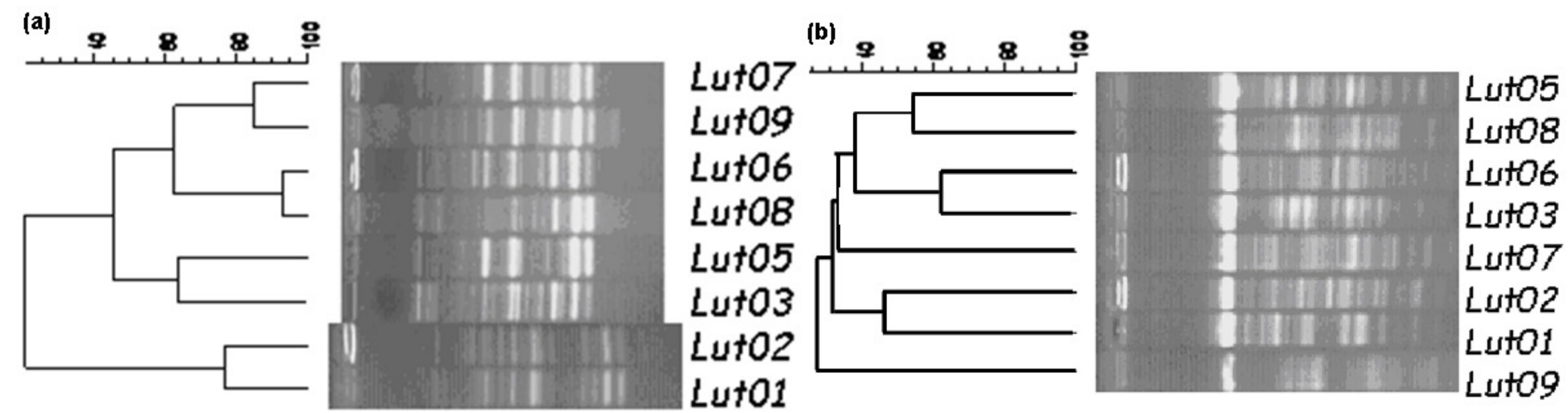


Figure II.19. Profils électrophorétiques et dendrogrammes obtenus pour les accessions de *L. luteus* à l'aide de l'amorce F3 (a) et F2 (b).

Tableau II. 23: Nombre, taille et diversité des marqueurs ISSR générés par les 8 populations de *L. luteus.*

Amorce	Marqueurs générés	Taille des bandes obtenues	Marqueurs polymorphes	PIC
F1	23	1415-123,27	23	0,94
F2	30	791,20-131,67	30	0,95
F3	30	1383-163,90	30	0,95
FL1	33	1384-126,99	33	0,96
FL2	18	800,55 -153,28	18	0,92
FL3	17	658,06-149,94	17	0,91
FL4	32	1703-137,02	32	0,95
FL5	29	1334-116,30	29	0,95
FL6	16	582,05-106,78	16	0,91
FL7	21	637,99-107,65	21	0,94
FL8	25	1406-133,83	25	0,95
FL9	26	1613-125,98	26	0,95
FL10	22	1343-104,92	22	0,94
FL11	36	987-122,02	36	0,96
Total	**358**	**104,92 - 1703**	**358**	**0,940±0,017**

II-2-2-3 Chez Lupinus luteus

Dans l`étude de la diversité intra- spécifique de *L. luteus* 14 amorces ISSR ont été maintenues et ont permis de générer une hétérogénéité de profils importante (Figure II.19). Ainsi, 358 bandes ISSR polymorphes ont été enregistrées avec une moyenne de 25,5 bandes par amorce (Tableau II.23). Le nombre de bandes été variable selon les amorces utilisées et d'une accession à une autre (Tableau II.24). Le poids moléculaire des bandes variait entre 104,92 et 1703 pb. On note que les amorces utilisées ont été très informatives selon les valeurs de l'indice de diversité calculées (PIC) qui variaient entre 0,91 et 0,96 avec une moyenne de 0,94 et un écart-type de 0,017.

Parmi les 358 marqueurs ISSR obtenus, 108 (30,16%) marqueurs uniques ont été enregistrés (Tableau II.25). Chacune des populations de *Luteus* a été caractérisée par un certain nombre de marqueurs spécifiques qui allait entre 10 (Lut03) et 24 (Lut05).

Tableau II.24: Marqueurs ISSR générés pour les accessions de *L. luteus* pour chaque amorce.

Amorce ISSR	***Nombre de marqueurs générés***							
	Lut09	***Lut08***	***Lut02***	***Lut06***	***Lut07***	***Lut03***	***Lut01***	***Lut05***
F1	6	7	5	8	9	8	5	6
F2	9	16	10	15	16	10	12	12
F3	12	13	11	14	12	17	12	14
FL1	9	13	11	11	4	8	12	11
FL2	4	5	7	7	8	8	7	7
FL3	9	5	6	6	6	6	7	8
FL4	12	14	4	14	14	8	6	12
FL5	5	7	6	9	8	6	7	11
FL6	5	7	5	6	6	3	6	8
FL7	8	7	8	6	5	7	9	5
FL8	6	5	4	11	11	4	5	12
FL9	4	6	4	9	5	5	5	12
FL10	4	5	4	3	4	6	4	7
FL11	10	13	12	15	10	10	9	14

Tableau II. 25: Marqueurs ISSR spécifiques des populations de *Lupinus luteus*

Accession	Marqueurs ISSR spécifiques
Lut09	*F3:934pb, FL1:708,76pb, FL3:658,06pb, FL3:260,67pb, FL4:475,49pb, FL4:325,62pb, FL4:182,90pb, FL5:150,54pb, FL5:987pb, FL6:106,78pb, FL11:436,16pb*
Lut08	*F1:247,58pb, F3:837,74pb, FL1:179,39pb, FL2:186,02pb, FL5:116,30pb, FL8:635,30pb, FL9:1355pb, FL10:487,61pb, FL10:366,83pb, FL10:222,58pb, FL10:104,92pb, FL11:647,38pb*
Lut02	*F1:403,96pb, FL1:579,59pb, FL1:144,58pb, FL5:164,29pb, FL5:215,39pb, FL7:419,14pb, FL9:497,40pb, FL10:124,70pb, FL11:516,79pb, FL11:360,83pb, FL11:122,02pb*
Lut06	*F1:556,09pb, F1:343,48pb, F1:224,01pb, F2:546,30pb, FL1:791,77pb, FL1:227,14pb, FL2:524,04pb, FL4:1236pb, FL4:559,54pb, FL4:153,38pb, FL4:153,38pb, FL6:555,26pb, FL8:133,83pb, FL9:337,19pb, FL11:987pb*
Lut07	*F2:791,20pb, F2:166,18pb, FL2:153,28pb, FL4:759,31pb, FL4:523,03pb, FL5:351,32pb, FL6:582,05pb, FL8:549,16pb, FL9:457,95pb, FL9:125,98pb, FL10:319,13pb, FL10:182,14pb, FL11:572,65pb*
Lut03	*F1:203,19pb, F3:1383pb, F3:1125pb, FL2:800,55pb, FL4:390,01pb, FL5:196,03pb, FL7:219,25BP, FL9:479,18BP, FL9:234,09pb, FL10:239,76pb*
Lut01	*F1:1071bp, F2:638,29bp, F3:209,33bp, FL1:1384pb, FL1:1024pb, FL1:207,93pb, FL3:203,03pb, FL5:205,11pb, FL5:511,49pb, FL6:378,97pb, FL9:422,17pb, FL10:1343pb*
Lut05	*F1:534,33pb, F1:425,78pb, F1:123,27pb, FL2:388,42pb, FL2:307,07pb, FL3:362,23pb, FL3:282,21pb, FL4:1703pb, FL5:1178pb, FL7:126,70pb, FL7:126,69pb, FL8:1406pb, FL8:576,22pb, FL8:437,70pb, FL9:1613pb, FL9:1449pb, FL9:206,52pb, FL9:142,52pb, FL10:1112pb, FL10:542,60pb, FL10:296,27pb, FL11:869,11pb, FL11:760,41pb, FL11:693,70pb*

II-2-2-3 a Matrice des distances génétiques

Les similarités génétiques entre les accessions de *L. luteus* ont été calculées sur la base des données ISSR et selon l'indice de diversité de Dice et les résultats figurent dans le tableau II.26. La similarité entre les différentes accessions été très importante vu les valeurs enregistrées. Les pourcentages de similarité les plus faibles étaient de 68,7; 69,7; 68,5 et 68,0 % et ont été obtenus entre des populations géographiquement éloignées. Par ailleurs, les pourcentages de similarité les plus élevés (88,7 et 88,5 %) ont été notés entre des populations de la région du Rharb (Lut03/Lut01 et Lut02/Lut01). Aussi, des pourcentages de similarité intermédiaires ont été enregistrés entre différentes populations et notamment entre deux populations de Khemisset (Lut07 et Lut08).

Tableau II. 26*:* Pourcentages de similarités obtenus entre les populations de *L. luteus*

Lut05	*100*							
Lut06	*83,7*	*100*						
Lut07	*76,2*	*79,8*	*100*					
Lut01	*77,4*	*74,6*	*75,5*	*100*				
Lut03	*80,4*	*80,9*	*80,6*	*88,7*	*100*			
Lut02	*73,8*	*73,6*	*74,9*	*88,5*	*87,9*	*100*		
Lut09	*68,7*	*71,3*	*69,7*	*71,6*	*75,0*	*73,3*	*100*	
Lut08	*74,5*	*74,1*	*72,5*	*68,5*	*73,2*	*68,0*	*81,8*	*100*

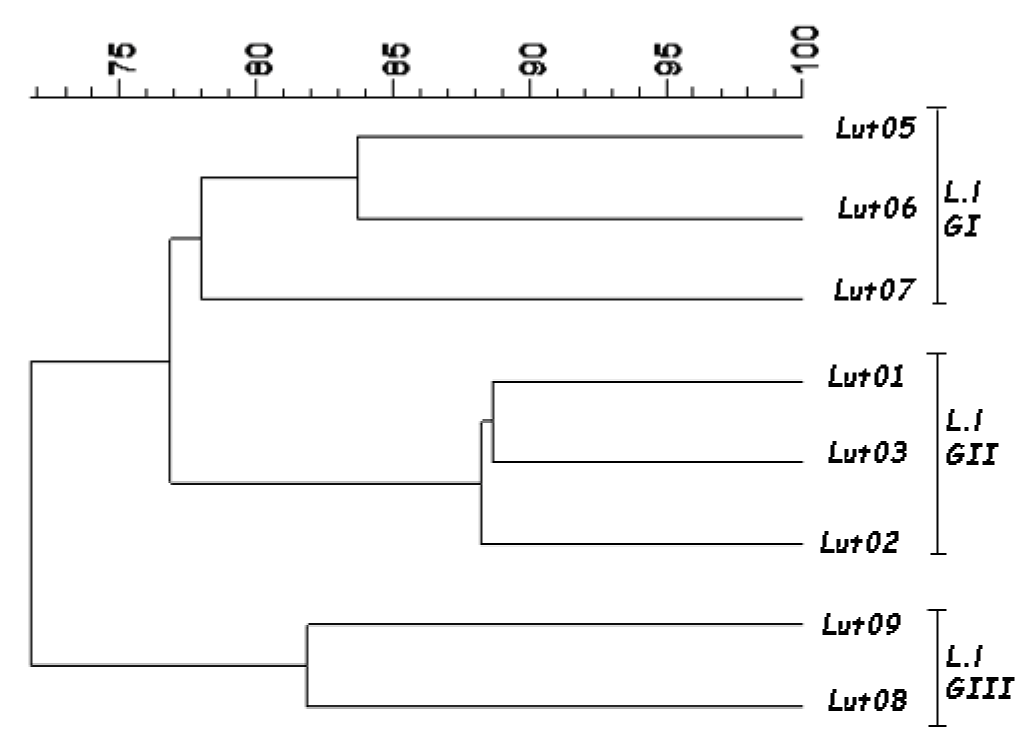


Figure II. 20. Dendrogramme en UPGMA des populations de *L. luteus* généré sur la base des marqueurs ISSR.

II-2-2-3 b Classification hiérarchique

Un dendrogramme a été élaboré sur la base des données ISSR, l'indice de diversité de Dice et la méthode d'agglomération UPGMA (Figure II.20). A un niveau de similarité de 75% le dendrogramme définit trois groupes probables ou clusters.

Le groupe I ou L.l-GI groupant trois accessions géographiquement peu éloignées (Lut05, Lut06 et Lut07).

Le groupe II ou L.l-GII avec trois accessions de la région du Rharb (Lut01, Lut02 et Lut03).

Le groupe III ou L.l-GIII réunissant une population de Khemisset (Lut08) et une population de Ouazzane (Lut09).

Une comparaison de ces trois groupes a été effectuée sur la base du nombre de marqueurs ISSR obtenus et aussi de la diversité générée (Tableau II.27). Ainsi, le groupe III (L.l-GIII) a été caractérisé par le nombre le plus élevé de marqueurs obtenus (592) et de diversité (0,004687) suivi par le groupe I (L.l-GI). Celui-ci a généré 450 marqueurs ISSR et une moyenne de diversité de 0,004686. Par contre, le groupe II (L.l-GII) a montré le minimum de marqueurs ISSR (341) et une moyenne de diversité de 0,004680.

Les trois groupes potentiels de *L. luteus* ont montré plusieurs marqueurs en commun. Par ailleurs, et à l'exception du groupe II (L.l-GII) les autres groupes ont été caractérisés par un certain nombre de marqueurs uniques. Ainsi, on retrouve 80 marqueurs ISSR spécifiques au groupe L.l-GI et 30 au groupe L.l-GIII.

Tableau II. 27: Information, diversité et Marqueurs ISSR uniques des sous groupes de *L. luteus.*

Groupes	**Accessions**	**Marqueurs**	**Diversité**	**Marqueurs spécifiques**
L.l -GI	Lut05- Lut06 – Lut07	450	0,004686	F1:556,09pb, F1:534,33pb, F1:425,78pb, F1:343,48pb, F1:224,01pb, F1:123,27pb, F2:791,20pb, F2:546,30pb, F2:346,99pb, F2:166,18pb, FL1:791,77pb, FL1:298,59pb, FL1:254,35pb, FL1:227,14pb, FL2:524,04pb, FL2:388,42pb, FL2:307,07pb, FL2:213,50pb, FL2:153,28pb, FL3:489,67pb, FL3:362,23pb, FL3:285,82pb, FL4:1703pb, FL4:1236pb, FL4:936pb, FL4:759,31pb, FL4:559,54pb, FL4:523,03pb, FL4:153,38pb, FL5:1334pb, FL5:1178pb, FL5:907pb, FL5:885,30pb, FL5:532,68pb, FL5:450,76pb, FL5:410,86pb, FL5:351,32pb, FL6:582,05pb, FL6:555,26pb, FL6:496,40pb, FL7:126,70pb, FL7:117,22pb, FL10:542,60pb, FL10:182,14, FL10:155,11pb, FL11:572,65pb, FL8:1406pb, FL8:787,44pb, FL8:678,73pb, FL8:576,22pb, FL8:549,16pb, FL8:437,70pb, FL8:173,48pb, FL8:133,83pb, FL9:1613pb, FL9:1449pb, FL9:551,03pb, FL9:457,95pb, FL9:337,19pb, FL9:206,52pb, FL9:142,52pb, FL9:125,98pb, FL10:1112pb, FL10:319,13pb, FL10:296,27pb, FL10:249,44pb, FL11:987pb, FL11:869,11pb, FL11:760,41pb, FL11:693,70pb, FL11:459,43pb
L.l- GII	Lut01- Lut02- Lut03	341	0,004680	Absent
L.l- GIII	Lut08-Lut09	592	0,004687	F1:247,58pb, F2:258,14pb, F3:934pb, F3:837,74pb, FL1:708,76pb, FL1:600,32pb, FL1:179,39pb, FL2: FL3:658,06pb, FL3:260,67pb, 186,02pb, FL4:475,49pb, FL5:987pb, FL5:491,59pb, FL5:150,54pb, FL5:116,30pb, FL6:108,58pb, FL6:106,78pb, FL8:635,30pb, FL9:1355pb, FL10:487,61pb, FL10:366,83pb, FL10:222,58pb, FL10:104,92pb, FL11:727,52pb, FL11:647,38pb, FL11:439,00, FL11:436,16

II-2-2-3 c Analyse en composantes principales

Une analyse en composantes principales ACP a été élaborée afin d`avoir une autre vision sur la structuration des différentes accessions de *L. luteus* (Figure II.21). Cette représentation a été effectuée selon les deux axes les plus informatifs F1 et F2 qui ont apporté 32,76 % de variabilité. On arrive clairement à retrouver les trois groupes prédéfini L.l-GI, L.l-GII et L.l-GIII. En plus, cette nouvelle distribution a permis de repérer les marqueurs ISSR ou variables (58) contribuant et appuyant la structuration des populations. La contribution de l`ensemble des marqueurs ISSR dans la structuration des populations de *luteus* selon les axes F1 et F2 est résumée dans l`annexe II.6.

II-2-2-3 d Distribution tridimensionnelle

Une distribution tridimensionnelle ou multidimensional scaling MDS a été élaborée sur la base des données ISSR et des pourcentages de similarités calculés (Figure II.22).

Cette représentation permet d`avoir une idée sur la distribution des populations de *L. luteus* dans un espace tridimensionnel selon les trois axes X, Y et Z. Comme c`est montré dans la figure II.22, les populations de *L. luteus* sont organisées en trois groupes potentiels I, II et III prédéfinis. Les trois groupes schématisés par les 3 ellipses sont indépendants l`un de l`autre. Ceci peut supposer une absence d`échange de gènes entre les trois groupes.

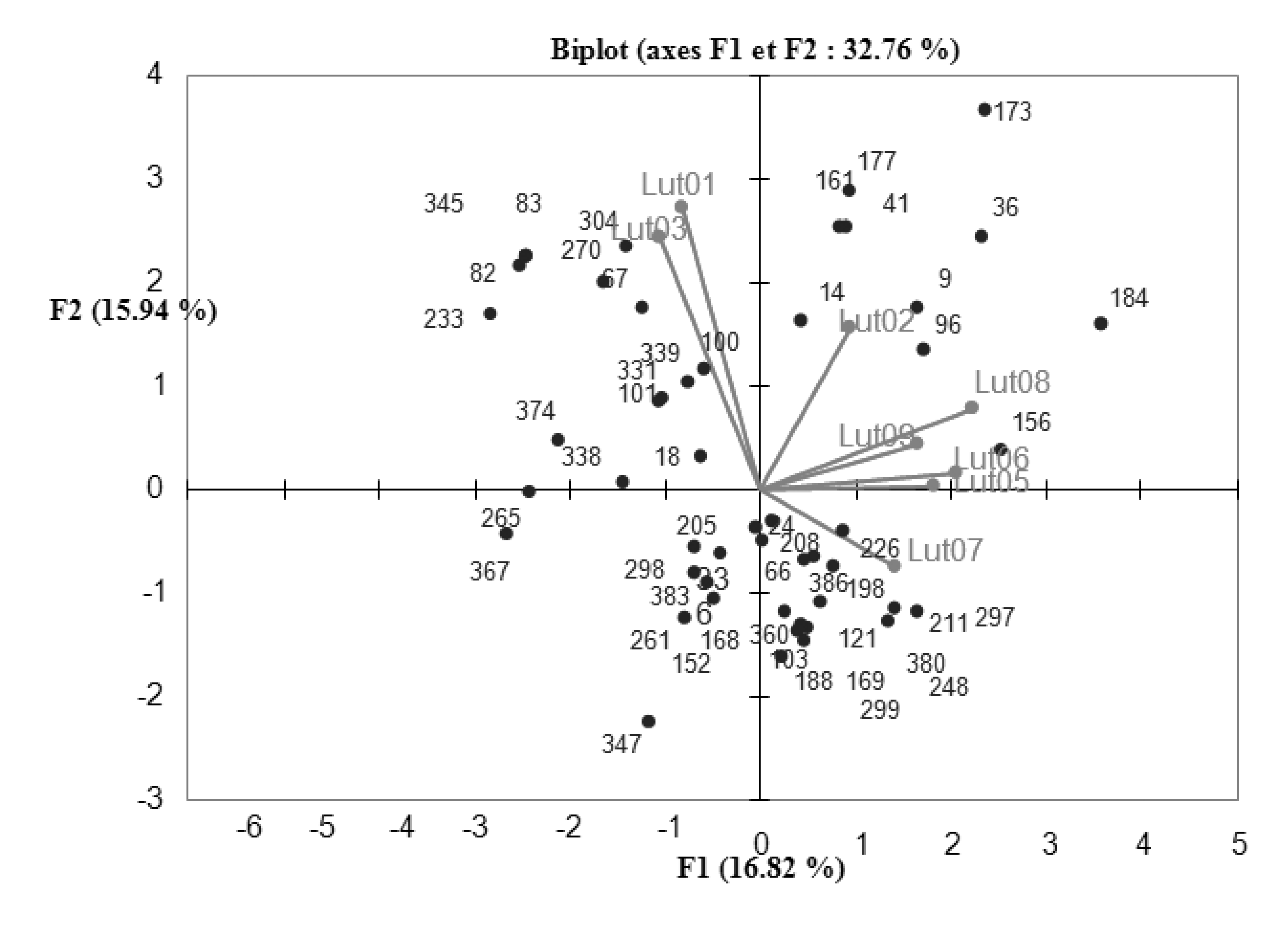


Figure II. 21: Analyse en composantes principales des populations de *L. luteus* sur la base des marqueurs ISSR

3 : F1:629,21pb, **4:** F1:556,09pb, **5 :** F1:534,33pb, **6 :** F1:509,15pb, **9 : F1:** 370,96pb, **8:** F1:403,96pb, **14 :** F1:279,33pb, **33 :** F2:502,23pb, **23 :** F1:123,27pb, **26 :** F2:717,13pb, **30:** F2:566,15pb, **33 :** F2:502,23pb, **36 :** F2:408,04pb, **37:** F2:387,42pb, **41 :** F2:314,59bp, **82:** F3:188,34pb, **83:** F3:163,90pb, **67:** F3:552,13pb, **20 :** F1:157,22pb**, 24 :** F2:791,20pb**, 38 :** F2:367,95pb, **66 :** F3:568,99pb**, 96 :** FL1:507,85pb**, 100 :** FL1:362,04pb**, 101 :** FL1:342,13pb, **103 :** FL1:298,59pb, **121:** FL1:791,74pb, **152 :** FL2:524,04bp, **156 :** FL2:372,25pb, **161 :** FL2:258,91pb, **168 :** FL3:658,06pb, **169 :** FL3:489,67pb, **173 :** FL3:308,47pb, **184 :** FL3:149,94pb, **188 :** FL4:936pb, **198 :** FL4:436,37pb, **205 :** FL4:282,51pb, **208 :** FL4:234,77pb , **211 :** FL4:194,47pb, **226 :** FL5:491,59pb, **233 :** FL5:334,92pb, **248 :** FL6:496,40pb, **261 :** FL6:106,78pb, **270 :** FL7:302,37pb, **297 :** FL8:296,82pb, **298 :** FL8:281,33pb, **299 :** FL8:256,33pb , **304 :** FL8:163,13pb, **331 :** FL9:164,52pb, **338 :** FL10:686,56pb, **339 :** FL10:639,33pb, **345 :** FL10:333,58pb, **347 :** FL10:296,27pb, **360 :** FL11:727,52pb, **367 :** FL11:516,79pb, **380 :** FL11:264,26pb**, 383 :** FL11:231,33pb**, 386**: FL11:181,87pb

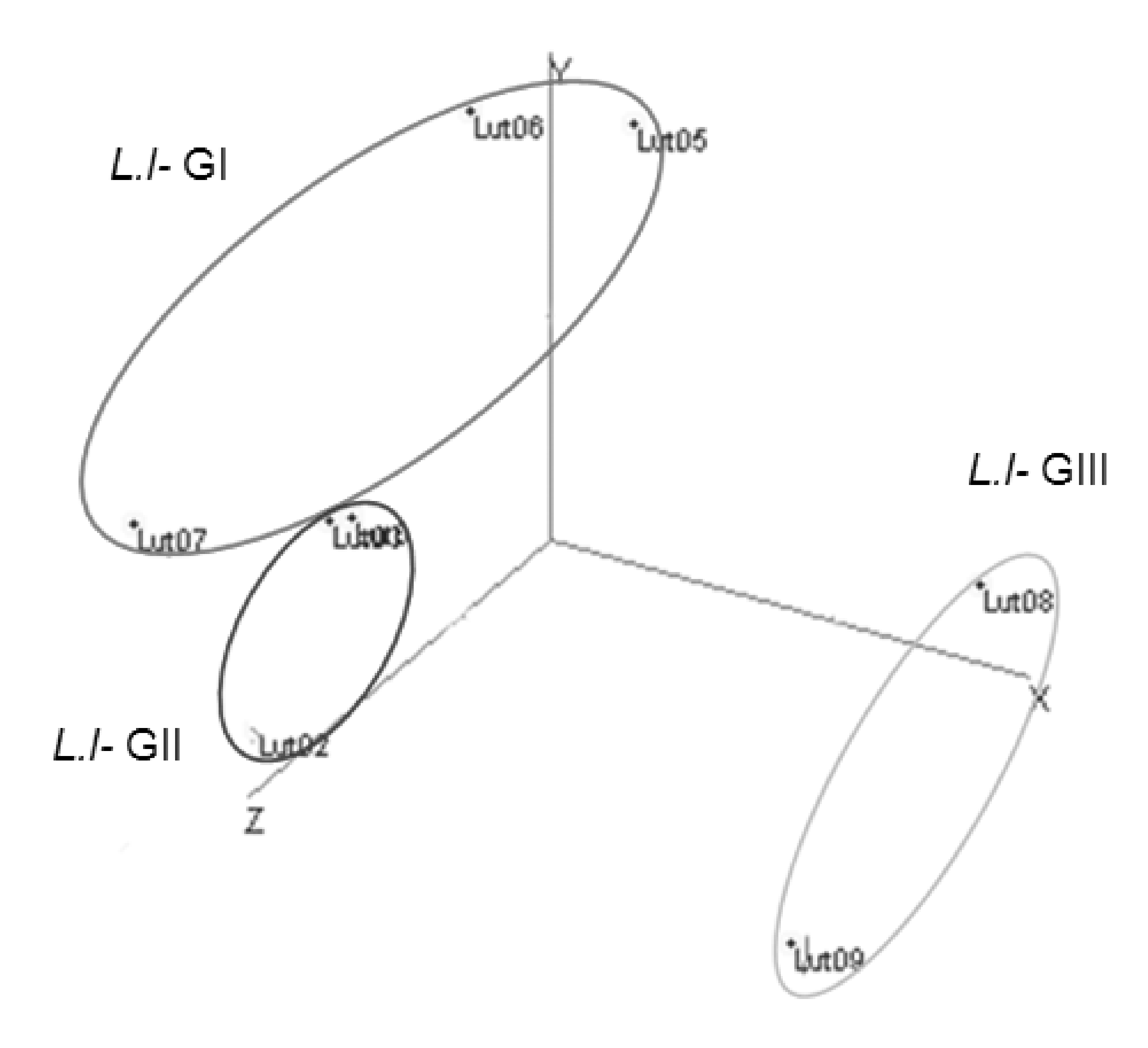


Figure II. 22. Représentation tridimensionnelle de type MDS des populations de *L. luteus* sur la base des marqueurs ISSR.

II-3 Conclusion

Le présent travail vise à approcher de la variabilité génétique d'une collection marocaine de lupin. Pour ceci cette étude de la diversité génétique du lupin a été menée au niveau inter et intra-spécifique.

L'analyse de la diversité inter- spécifique a portée sur quatre espèces de lupin *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. cosentinii* et *L. luteus*. Dans cette étude, les marqueurs ISSR et AFLP ont été choisis et utilisés sur la base des ADN bulk des quatre espèces de lupin.

La diversité inter- spécifique du lupin du Maroc abordée en utilisant comme moyen les marqueurs ISSR et AFLP a été très intéressante.

Les 11 amorces ISSR et 10 combinaisons d'amorces AFLP se sont avérées hautement informatives. Le nombre de bandes révélées a été important aussi bien dans le cas des marqueurs AFLP qu'ISSR. Néanmoins, les marqueurs AFLP ont permis de générer plus de bandes que les marqueurs ISSR (Figure II.23 et II.24). Ainsi, 234 fragments AFLP ont été enregistrés chez *L. albus*, 275 chez *L. cosentinii*, 277 chez *L. angustifolius* et 278 chez *L. luteus*. En outre, 79 bandes obtenues chez *L. luteus*, 88 chez *L. albus*, 89 chez *L. angustifolius* et 103 chez *L. cosentinii*.

Par ailleurs, les quatre espèces de lupin ont été caractérisées par des marqueurs ISSR et AFLP uniques. Le nombre de marqueurs AFLP uniques (322) obtenus a été plus important que celui des marqueurs ISSR uniques (69). Ces marqueurs uniques peuvent être interessant dans l'identification des espèces de lupins marocains. Le sequençage de ces marqueurs uniques peut être interessant dans l'identification des espèces de lupin du Maroc.

Les marqueurs ISSR et AFLP ont permis de generer deux dendrogrammes proposant des representations differentes des quatres espèces étudiées. On deduit que chacun des deux marqueurs engendre une évaluation differente de la similarité génétique entre les espèces de lupin.

D'un autre côté, le degré de variabilité génétique de chacune des espèces étudiées sur la base des marqueurs ISSR a été évalué moyennant l'indice de diversité de Nei Iij.

Pour les marqueurs ISSR, les valeurs de diversité Iij ont été de l'ordre 0,1073198 pour *L. luteus*, de 0,01074605 pour *L. albus*, de 0,01074744 pour *L. angustifolius* et de 0,1076404 pour *L. cosentinii*. Ceci, suggère que *L. cosentinii* qui est une espèce sauvage présente le plus de diversité génétique alors que l'espèce cultivée *L. luteus* montre une faible diversité.

Les marqueurs AFLP, par contre proposent un autre schéma de diversité des quatre espèces. Les valeurs de diversité de Nei étaient de 0,003913 pour *L. luteus*, de 0,0039150 pour *L. angustifolius* et *L. cosentinii* et de 0,0039151 pour *L. albus*. Ainsi, en utilisant les marqueurs AFLP *L. albus* a montré le plus de diversité par rapport à *L. luteus* qui présente la plus faible diversité. Notons, que ces deux espèces de lupin sont les deux espèces de lupin cultivées au Maroc.

D'un autre côté, la similarité entre les espèces de lupin a été calculée moyennant l'indice de diversité de Dice et sur la base des marqueurs ISSR et AFLP. Les résultats obtenus ont été utilisés pour élaborer une classification hiérarchique en UPGMA et une analyse factorielle. A la lumière des résultats obtenus deux schémas potentiels de classification des quatre espèces ont été proposés.

La deuxième partie de ce travail a porté sur l'étude de la diversité intra- spécifique de *L. albus*, *L. cosentinii* et *L. luteus*. Dans ce volet de travail, les marqueurs ISSR ont été hautement informatifs de part les valeurs de l'indice de diversité ou PIC calculées. Ces valeurs ont été proches de 1 avec 0,927 pour *L. albus*, 0,94 pour *L. luteus* et de 0,956 pour *L. cosentinii*.

Le nombre de bandes ISSR générées a été important. On note 358 fragments ISSR révélés chez *L.luteus*, 402 chez *L. albus* et 547 chez *L. cosentinii*. Le niveau de variabilité génétique des trois espèces étudiées sur la base des marqueurs ISSR s'est avéré très important. En effet, le taux de polymorphisme révélé était très élevé avec 100% de polymorphisme chez *L. luteus* et *L. cosentinii* et 97,7% chez *L. albus*.

Chacune des trois espèces de lupin a été caractérisée par des marqueurs ISSR uniques. A un niveau plus fin d'analyse, chaque population représentant une région géographique donnée a été caractérisée par au moins un marqueur spécifique. Ainsi chaque population peut être considerée comme une entité conservée.

Au sein de chaque espèce une comparaison des différentes populations sur la base de leurs similarités a été effectuée selon l'indice de diversité de Dice. Les distances génétiques entre les populations étudiées ont été évaluées à partir des pourcentages de similarités calculés. A la lumière de ces résultats une classification hiérarchique ainsi qu'une représentation tridimensionnelle ont été élaborées.

On note que les accessions s'organisent en groupes ou sous- groupes. En effet, nous avons définit trois groupes chez *L. albus*, deux groupes et cinq sous- groupes chez *L. cosentinii* et trois groupes chez *L. luteus*.

Globalement, la structuration des différentes accessions et la classification hiérarchique des groupes obtenus mettent en relief le degré de similarité et de diversité entre les populations étudiées. Par contre, le regroupement des différentes populations n'a pas été clairement corrélé à leurs origines géographiques.

Par ailleurs, la comparaison de l'ensemble des populations du lupin a été effectuée sur la base des marqueurs ISSR et en utilisant l'indice de diversité de Dice. A la base des résultats obtenus, une classification hiérarchique en UPGMA (Annexe II.7), une analyse factorielle ainsi qu'une représentation tridimensionnelle de type MDS (Annexe II.8) ont été optimisées.

Les marqueurs ISSR utilisés ont assuré une bonne structuration et séparation des trois espèces analysées *L. albus*, *L. cosentinii* et *L. luteus.*

Le système de reproduction du lupin à savoir l'autogamie et l'allogamie peut supposer un flux de gènes entre les populations d'une même espèce. Par ailleurs, l'autogamie et l'allogamie peuvent expliquer la similarité entre les accessions de differentes origines géographiques.

Dans le present travail, on montre que le genome du lupin est très riche avec les motifs repetés (AG), (GA), (CA) et (GT). Selon Wang et al (1994), les motifs (AT)n et (AG)n sont les plus microsatellites les plus fréquents chez les plantes. Selon les résultats ISSR obtenus dans ce travail, on note que la proportion des motifs (GA)n est plus importante que celle des motifs (CA)n. Cette carectéristique a aussi été decrite chez plusieurs plantes (Gupta et al., 1994).

L'abondance des microsatellites comme les motifs GAGA semblent être impliqués dans la régulation des gnes et le contrôl de l'expression chez les mammiferes et les plantes (Sangwan & Brian, 2002; Santi *et al.*, 2003; Van Steensel *et al.*, 2003). Le motif répété GA a été très utilisé chez plusieurs germplasmes dans l'identification des variations alléliques des gènes liés au stress (Reddy *et al.*, 2009).

Par ailleurs, d'autres motifs comme (CA)n, (AC)n ou (GT)n ont été très bien étudiés chez les mammifères (Jingyi Hui *et al.*, 2003; Jung-Hee *et al.*, 2004; Jingyi Hui *et al.*, 2005; Dżamila *et al.*, 2006). Néanmoins, la fonction de ces éléments reste encore inconnue.

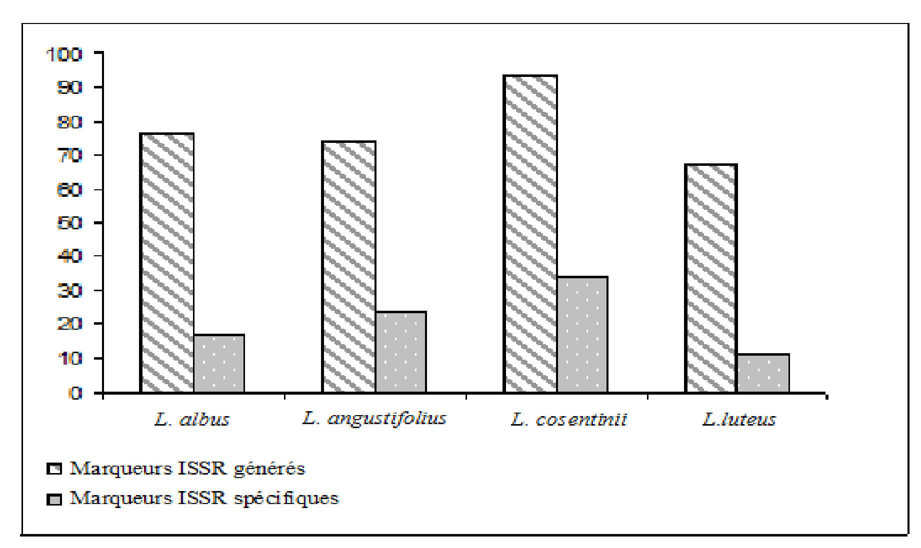


Figure II.23. Nombre de marqueurs ISSR générés et spécifiques par espèce de lupin utilisée.

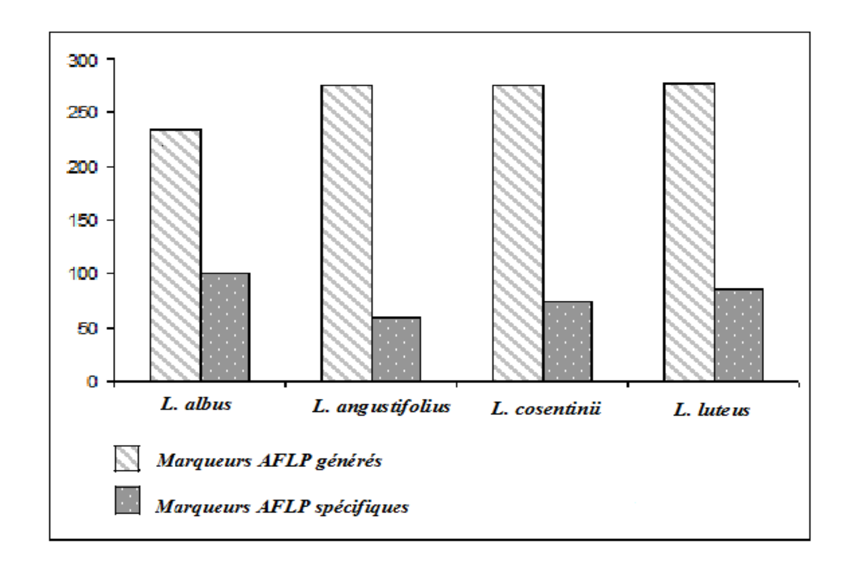


Figure II.24. Nombre de marqueurs AFLP générés et spécifiques par espèce de lupin étudiées.

CHAPITRE III :
Stress abiotique et facteurs de transcription chez le lupin blanc

INTRODUCTION

Au cours ce cette étude nous nous sommes intéressés aux facteurs de transcription FT du *Lupinus albus*. Une analyse de l'expression de 161 FT chez le lupin blanc en réponse à différents stress abiotiques a été réalisée moyennant des filtres à ADNc ou macroarrays. Ensuite, nous nous sommes intéressés à un FT particulier, le Scarecrow SCR. Le gène SCR isolé chez le lupin blanc a été analysé en détail avec l'isolement de ses deux copies LaSCR1 et LaSCR2, leurs expression au niveau du système racinaire et leurs fonctions chez *Lupinus albus* et *Medicago truncatula*.

III-1 Criblage d`une banque de facteurs de transcription

Cette étude a porté sur l'analyse de l'expression de quelques facteurs de transcriptions FT au niveau des feuilles et du système racinaire du lupin blanc en réponse à différents stress. Les plantes de *L. albus* ont été soumises à différents stress et ont été ainsi cultivées en absence d'azote (-N), de fer (-Fe) ou de phosphore (-P). Nous avons analysé l'expression de 161 clones ou étiquettes EST (expressed sequence tags) correspondant à 72 contigs (Tableau III.1) et à 88 singletons (Tableau III.2). Aussi, 18 marqueurs d'expression ont été utilisés (Tableau III.3). Ces marqueurs comprennent des marqueurs positifs comme le Mate qui ne s'exprime qu'au niveau des racines proteoïdes. Les gènes d'expression invariable ou marqueurs de ménages ou encore housekeeper genes, choisis sont la polyubiquitine et l'alphatubuline. Ceux-ci, s'expriment au même degré au niveau des trois organes du lupin analysés, les feuilles, les racines normales et les racines proteoïdes. Aussi le gène humain myosine est utilisé comme marqueur négatif.

Tableau III.1: Liste des étiquettes contigs utilisées dans cette étude.

Contigs	Code ESTs	Code NCBI	Annotation
Contig21	888_F	CA410619	DEAD/DEAH box helicase, N-terminal
Contig108	818_F	CA410551	
	E080_F	CA410807	Sigma-54 factor, interaction region
Contig119	889_F	CA410620	
	783_F	CA410518	Myb, DNA-binding
Contig133	880_F	CA410612	
	619_F	CA410347	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)
Contig165	37_F	CA410119	
	285_F	CA410024	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
Contig197	1021_F	CA409485	
	735_F	CA410468	No apical meristem (NAM) protein
Contig254	E702_F	CA411403	
	E732_F	CA411433	
	1402_F	CA409847	
	E647_F	CA411349	
	138_F	CA409834	HMG1/2 (high mobility group) box
Contig96	545_F	CA411250	
	1325_F	CA409775	Histone core
Contig304	411_F	CA410149	
	625_F	CA410353	
	637_F	CA410365	
	365_F	CA410107	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
Contig165	37_F	CA410119	
	285_F	CA410024	pfam_AP2_AP2 domain
Contig358	405_F	CA410142	
	739_F	CA410472	
	53_F	CA410272	UniRef100_Q9M4Y9 AP2-related transcription factor [*Mesembryanthemum crystallinum*]
	86_F	CA410601	
	88_F	CA410621	
Contig258	E137_F	CA410862	Homeobox
Contig390	E560_F	CA411265	DEAD/DEAH box helicase, N-terminal

Tableau III.1 (suite): Liste des étiquettes contigs utilisées dans cette étude et non encore déposées dans la banque de gène.

Contig	**Code ESTs**	**Annotation**
Contig383	*YPR_005_E05_036.ab1*	Methyl-CpG binding
	YPR_009_H08_064.ab1	
	YPR_009_D11_090.ab1	
	YPR_008_A08_054.ab1	
	YPR_008_A07_050.ab1	
	YPR_003_A05_033.ab1	
Contig421	*YPR_010_E03_020.ab1*	DNA-binding WRKY
	YPR_008_D10_079.ab1	
	YPR_013_F04_031.ab1	
	YPR_013_E04_023.ab1	
	YPR_013_E07_051.ab1	
	YPR_001_B03_025.ab1	
	YPR_008_E12_088.ab1	
	YPR_009_E11_083.ab1	
	YPR_006_D12_095.ab1	
	YPR_002_C05_034.ab1	
	YPR_007_F07_059.ab1	
	YPR_010_B03_026.ab1	
	YPR_002_F06_047.ab1	
	YPR_009_G08_056.ab1	
	YPR_007_H10_080.ab1	
	YPR_001_G03_020.ab1	
	YPR_006_A05_034.ab1	
Contig331	*YPR_008_A04_022.ab1*	Basic leucine zipper
	YPR_010_A05_034.ab1	
	YPR_009_C01_002.ab1	
	YPR_008_C12_087.ab1	
Contig276	*YPR_009_G07_052.ab1*	Sigma-54 factor, interaction region
	YPR_010_H08_073.ab1	
Contig216	*YPR_002_D11_090.ab1*	UniRef100_Q2QWI0 RNA polymerase Rpb3/Rpb11 dim
	YPR_003_E10_071.ab1	
Contig415	*YPR_006_G10_081.ab1*	Pas de similarité
	YPR_010_F10_080.ab1	
	YPR_001_G11_084.ab1	
Contig258	*YPR_005_F11_092.ab1*	Homeobox
Contig390	*YPR_005_B06_046.ab1*	DEAD/DEAH box helicase, N-terminal
	YPR_002_F03_027.ab1	
	YPR_008_B06_046.ab1	
	YPR_002_E12_087.ab1	
	YPR_011_E05_036.ab1	
	YPR_013_H02_016.ab1	

Tableau III.2. Liste des étiquettes singletons

Code EST	Code NCBI	Description
1028_F	CA409491	UniRef100_Q6IEL0 WRKY transcription factor 71 [*Oryza sativa*]
1053_F	CA409515	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
1182_F	CA409642	UniRef100_P41152 Heat shock factor protein HSF30 [*Lycopersicon peruvianum*]
1206_F	CA409665	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
122_F	CA409690	Heat shock factor (HSF)-type, DNA-binding
1280_F	CA409729	Plant specific eukaryotic initiation factor 4B
1355_F	CA409799	DNA-binding WRKY
1358_F	CA409801	UniRef100_Q6DG70 Zgc:91962 [*Brachydanio rerio*]
137_F	CA409823	StTC127390_"similar to TIGR_Ath1|At5g16780.1 68418.m01965 SART-1 family protein contains Pfam domain, PF03343: SART-1 family, partial (61%)"
1412_F	CA409857	GhTC36042_similar to UP|Q93YF1 (Q93YF1) Nucleic acid binding protein, partial (68%)
1425_F	CA409868	MtTC94757_similar to UP|Q43457 (Q43457) Heat shock transcription factor 34, partial (86%)
147_F	CA410642	GmTC217902_similar to UP|Q8S490 (Q8S490) Transcription factor RAU1 (Fragment), partial (69%)
160_F	CA410651	Heat shock factor (HSF)-type, DNA-binding
176_F	CA410673	MtTC107060_similar to UP|Q69QY4 (Q69QY4) ARF GAP-like zinc finger-containing protein-like, partial (51%)
204_F	CA410676	StTC119999_similar to GB|AAM60832.1|21536500|AY084233 DNA-binding WRKY-like protein {*Arabidopsis thaliana*;}, partial (44%)
212_F	CA410723	No apical meristem (NAM) protein
281_F	CA410792	MtTC111111_similar to UP|SUV1_ARATH (Q9FF80) Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific 1 (Histone H3-K9 methyltransferase 1) (H3-K9-HMTase 1) (Suppressor of variegation 3-9 homolog 1) (Su(var)3-9 homolog 1) , partial (7%)
325_F	CA410814	UniRef100_Q9SK33 Probable WRKY transcription factor 60 [*Arabidopsis thaliana]*
368_F	CA410819	SBP
369_F	CA410860	Ribonuclease CAF1
389_F	CA410990	Myb, DNA-binding
407_F	CA411045	Tubby
445_F	CA411079	UniRef100_Q94705 DNA topoisomerase I [*Physarum polycephalum*]
493_F	CA411094	Transcription factor, MADS-box
521_F	CA411099	Transcription factor, MADS-box
523_F	CA411104	UniRef100_Q8RYD6 Basic leucine zipper transcription factor [*Arabidopsis thaliana*]
524_F	CA411106	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
526_F	CA411170	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
558_F	CA411179	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH
679_F	CA411184	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
719_F	CA411191	Transcription factor IIA, alpha/beta subunit
756_F	CA411197	Tubby
811_F	CA411207	Ribonuclease CAF1
842_F	CA411208	KNOX1
875_F	CA411484	HhH-GPD
882_F	CA410614	UniRef100_Q5VRX5 WRKY transcription factor 6-like [*Oryza sativa*]
90_F	CA410642	Tubby
931_F	CA410651	pfam_SRP19_SRP19 protein
93_F	CA410673	UniRef100_Q9FNV1 Somatic embryogenesis related protein [*Dactylis glomerata*]

Tableau III.2 (suite). Liste des étiquettes singletons

Code EST	Code NCBI	Description
942_F	CA410676	Eukaryotic transcription factor, DNA-binding
993_F	CA410723	UniRef100_Q9ZQ70 Probable WRKY transcription factor 3 [*Arabidopsis thaliana*]
E063_F	CA410792	MtTC96597_homologue to UP|Q6YBV9 (Q6YBV9) Cryptochrome 1 apoprotein, partial (50%)
E087_F	CA410814	Homeobox
E092_F	CA410819	Zinc finger, Dof-type
E135_F	CA410860	Myb, DNA-binding
E272_F	CA410990	Histone H2B
E333_F	CA411045	GmTC205053_homologue to UP|Q8L5W2 (Q8L5W2) BZIP transcription factor ATB2, partial (89%)
E368_F	CA411079	Transcription factor jumonji/aspartyl beta-hydroxylase
E385_F	CA411094	UniRef100_Q3AFJ1_TPR domain protein [Carboxydo
E392_F	CA411099	pfam_BTB_BTB/POZ domain
E397_F	CA411104	Tubby
E399_F	CA411106	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
E463_F	CA411170	GmTC215369_"UP|O22465 (O22465) GH1 protein (Fragment), complete"
E473_F	CA411179	UniRef100_Q8LBV8_Putative DNA binding protein
E478_F	CA411184	MtTC106609_"similar to UP|GIGA_ARATH (Q9SQI2) GIGANTEA protein, partial (90%)"
E485_F	CA411191	RING/U-box
E491_F	CA411197	14-3-3 protein
E501_F	CA411207	ssDNA-binding transcriptional regulator
E502_F	CA411208	Transcription initiation Spt4
E520_F	CA411225	UniRef100_Q5VQY5_Putative ring finger protein
E529_F	CA411234	AtTC261385_"UP|ERF4_ARATH (O80340) Ethylene responsive element binding factor 4 (AtERF4), complete"
E541_F	CA411246	GmTC218149_"similar to UP|Q70I27 (Q70I27) SAR DNA-binding protein-like protein, partial (57%)"
E545_F	CA411250	GmTC216457_similar to GB|AAS58510.1|45357102|AY550299 MYB transcription factor {*Arabidopsis thaliana*;} , partial (27%)
E585_F	CA411289	Histone H2B
E598_F	CA411302	GmTC219208_"weakly similar to UP|Q948K9 (Q948K9) CmE8 protein, partial (87%)"
E627_F	CA411329	Zinc finger, C2H2-type
E630_F	CA411332	UniRef100_Q94KS0_Histidine-containing phosphot
E659_F	CA411361	Histone H3
E692_F	CA411393	UniRef100_Q5Z9H7_Zinc finger protein-like [Oryza sa
E706_F	CA411407	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
E730_F	CA411431	Heat shock protein Hsp90
E742_F	CA411431	LIM, zinc-binding
E745_F	CA411445	SET domain
E749_F	CA411449	UniRef100_Q56X14_Auxin response factor 9 [Arab
E755_F	CA411455	Histone deacetylase superfamily
E758_F	CA411458	GmTC229886_"similar to UP|TAFA_MOUSE (Q8K0H5) Transcription initiation factor TFIID subunit 10 (Transcription initiation factor TFIID 30 kDa subunit) (TAF(II)30) (TAFII-30) (mTAFII30), partial (7%)"

Tableau III.2 (suite). Liste des étiquettes singletons

Code EST	Code NCBI	Description
E761_F	CA411462	Histone core
E771_F	CA411470	Histone H1/H5
E775_F	CA411474	GRAS transcription factor, SCR
E785_F	CA411484	MtTC100497_"similar to UP|Q7Y1B6 (Q7Y1B6) GAI-like protein, partial (72%)"
E794_F	CA411493	GmTC220681_"similar to UP|Q6Z2V7 (Q6Z2V7) NHL repeat-containing protein-like, partial (27%)"
E817_F	CA411515	GmTC203635_"similar to PIR|T46225|T46225 alpha NAC-like protein - *Arabidopsis thaliana*, partial (71%)"
E844_F	CA411542	GmTC214290_"homologue to UP|Q6UJX5 (Q6UJX5) Molecular chaperone Hsp90-2, complete"
E848_F	CA411546	TIP49, C-terminal
E849_F	CA411547	MtTC109325_"similar to UP|Q6AXI9 (Q6AXI9) Zgc:101129 protein, partial (33%)"
YPR_011_A07_050. ab1_5_ORF1	-	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
YPR_012_H04_032. ab1_1_ORF2	-	HMG1/2 (high mobility group) box
YPR_013_C11_082. ab1_1_ORF1	-	Helix-loop-helix DNA-binding

(-) Etiquettes non encore déposées dans la banque de gènes NCBI.

Tableau III.3. Liste des marqueurs d'expression utilisés dans les filtres à ADN.

Marqueur	Code EST	Annotation	Expression chez le lupin blanc
M1	371_F	Similaire au cytokinin oxidase	RP de 14 JAE et RN (-P/+P)
M2	847_F	Similaire au cytokinin oxidase	
M3	-	Myosine (gène humain)	Pas d'expression
M4	468_F	Alfa tubuline	RP, RN (-P/+P) et F (-P/+P)
M5	187_F	Formamidase	RP de 14JAE
M6	901_F	Novel phosphatase	RP (-P), RN (-P) et F (-P)
M7	1359_F	Polyubiquitine	RP, RN (-P/+P) et F (-P/+P)
M8	131_F	MATE	RP de 14 JAE
M9	449_F	MATE	
M10	471_F	MATE	
M11	584_F	MATE	
M12	685_F	MATE	
M13	729_F	MATE	
M14	1020_F	MATE	
M15	1160_F	MATE	
M16	1281_F	MATE	
M17	1297_F	MATE	
M18	1141_F	NAD-dependent glyceraldehyde-3P Dehydrogenase	RN (-P/+P), F (-P/+P) et surexpression au niveau des RP

RP: racines proteoïdes, RN: racines normales, F: feuilles, JAE: jours après emergence, (-P/+P) conditions de culture en absence/présence de phosphore, JAE: jours après emergence.

III-1-1 Approche expérimentale

III-1-1-1 Préparation des Filtres à ADNc

Les clones EST sont insérés dans le vecteur pbluescript et stockés dans du glycérol à - 80°C. Ces clones ont été mis en culture dans du milieu LB additionné d'ampicilline à 37°C pendant 16 à 18h. A partir de ces cultures liquides les plasmides ont été extraits, purifiés et les inserts ont été isolés par PCR. L'amplification a été optimisée dans un volume de 100 µl contenant: 20 ng d'ADN plasmidique, tampon PCR 10X (Promega), 10µM d'amorce universelle T3 et 10µM d'amorce universelle T7, 10mM de dNTP, 5 Unités de Taq polymérase. La PCR a été réalisée selon le programme suivant: 2 min à 95 °C, 35 cycles de 30 s à 95°C suivis de 30 s à 55°C puis 2 min à 72 °C et avec une étape d'élongation de 7 min à 72°C. Les amplifias sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% et seuls les échantillons présentant des bandes uniques et nettes sont maintenus. A partir des produits PCR, 42 clones ont été pris au hasard et séquencés afin de vérifier le résultat de l'amplification.

Les produits PCR ou sondes ont été déposés à raison de 0,2 µl et à quatre répétitions sur des membranes de Nylon chargées positivement (Amersham Hybon +). Le dépôt a été effectué par un automate Q-bot (Genetix). Les membranes ont été déposées (face en haut) sur du papier Whatman (Whatman, Clifton, NJ) imbibé d'une solution de dénaturation (5 M NaCL et 0,5 M NaOH) pendant 10 min et d'une solution de neutralisation (1,5 M NaCL; 0,5 M Tris-HCL (PH 7.2) et 1 mM EDTA) pendant 5 min. Les membranes ont été séchées et exposées à 120 joules cm^{-2} sous rayons UV cross linker afin de fixer les ADN.

III-1-1-2 Préparation des cibles radioactives

Les plantes du *Lupinus albus* (var. Ultra) ont été cultivées dans la chambre de culture à une température de 20/15°C et un cycle de 16/8 h lumière/obscurité (Johnson *et al.*, 1996). Les plantes sont arrosées un jour sur deux avec 500 ml de solution nutritive, contenant du phosphore (+P); sans phosphore (-P); sans azote (-N) ou sans fer (-Fe).

Les plantes témoins (+P) reçoivent 500 ml de solution nutritive complète contenant: 3,0 mM KNO_3; 2,5 mM $Ca(NO3)_2$; 0,5 mM $Ca(H_2PO_4)2$; 1,0 mM $MgSO_4$; 12,0 mM Fe (as FeEDTA); 4,0 mM $MnCl_2$; 22,0 mM H_3BO_3; 0,4 mM $ZnSO_4$; 0,05 mM $NaMoO_4$; et 1,6 mM CuSO4. Par contre, Les plantes cultivées en conditions de carences reçoivent différentes solutions nutritives. Ainsi,

en cas de stress phosphorique (-P), 0,5 mM de $CaSO_4$ est ajoutée au lieu de 0,5 mM de $Ca(H_2PO_4)$. Dans le cas d'une carence d'azote (-N), 3 mM de KCL est ajoutée au lieu de 3 mM de KNO3 et 2,5 mM de $CaSO_4$ au lieu de $Ca(NO_3)2$. Alors que les plantes cultivées en conditions de stress ferrique (-Fe) ne reçoivent pas le FeEDTA.

Les racines normales (RN), les racines proteoïdes (RP) et les feuilles (F) du lupin ont été collectées après 12 et 14 Jours après émergence (JAE). Les ARN totaux ont été isolés et purifiés (annexe III. 1) et utilisés pour la préparation des cibles radioactives. Les ARN totaux ont été ainsi reversement transcrits et marqués par l'isotope ^{32}PdATP. Ainsi, 30 µg d'ARN sont incubés avec 1µl d'amorce poly dT (Sigma) pendant 10 min à 70°C et refroidit dans de la glace. La transcription inverse a été réalisée dans un volume de 20 µl contenant le mélange d'ARN; 4µl du tampon First Strand 5X (Super script Kit, GibcoBRL); 2µl de DTT 0,1M; 1µl de mélange de dNTP (0,25 mM de dATP; 10 mM de dCTP; 10 mM de dTTP et 10 mM de dGTP), 5µl de l'isotope ^{32}P-dATP et 1µl de la superscript reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La retro- transcription est assurée pendant 1 heure à 42°C. Le mélange est ensuite purifié dans une colonne de sephadex pour éliminer les nucléotides non incorporés. Le mélange de la cible radioactive est dénaturé avant l'utilisation.

II-1-1-3 Hybridation des membranes

Les membranes sont préhybridées pendant au moins 5 min à 42°C dans une cassette d'hybridation et avec le tampon (0,5 V de Formamide; 1M Na_2HPO_4 (pH. 7,2); 4M NaCL; SDS à 7% et 0,5 M l'EDTA)

L'hybridation des membranes est optimisée pendant un minimum de 12 heures à 42°C dans un nouveau volume de tampon de pré hybridation additionné de 1 million Cpm (count per minute) par ml de cible radioactive.

Après l'hybridation, les membranes sont successivement lavées à 42°C pendant 30 min dans chacun des trois tampons suivants: SSC 2X/ 0,1% SDS, SSC 0,5X/ 0,1% SDS et ensuite dans SSC 0,1X/ 0,1% SDS. Les filtres à ADN sont ensuite enveloppés dans du plastique (papier Saran) et exposées aux écrans d'intensification contenant du phosphore pendant 4 jours à température ambiante. Les écrans de phosphore sont scannés et les images traitées par le programme

ImageQuant. Les points obtenus ou spots sont repérés et convertis en valeurs numériques pour quantifier l'expression des gènes. Les résultats bruts sont présentés sous forme de fichier Excel.

III-1-2 Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont organisés en séparant les transcrits invariants ou houskeeping genes (Ubiquitine ou Alphatubuline), les gènes à expression connue (Mate, Cytokinine oxidase……) et les gènes dont on veut étudier l'expression. Le résultat des expériences est ensuite normalisé afin de minorer les variations artefactuelles des intensités. Ceci, consiste à appliquer une correction mathématique aux données brutes pour que les échantillons (témoins et expériences) soient comparables. Le but est de rapprocher les distributions des intensités de fluorescence d'une loi normale pour procéder ensuite aux calculs statistiques. Ainsi, les courbes de régression en nuage de points sont basées sur la comparaison des intensités des signaux des expériences deux à deux en utilisant le Log2 ratio d'intensités. La figure III.1 présente des courbes de régression de quatre expériences indépendantes comparées deux à deux. Ces courbes permettent de vérifier la normalisation des résultats d'une expérience à une autre. On note que pour chaque courbe des points sortent de la ligne de pente. Ces points situés en haut ou en bas de la ligne de normalisation représentent respectivement des gènes induits ou réprimés.

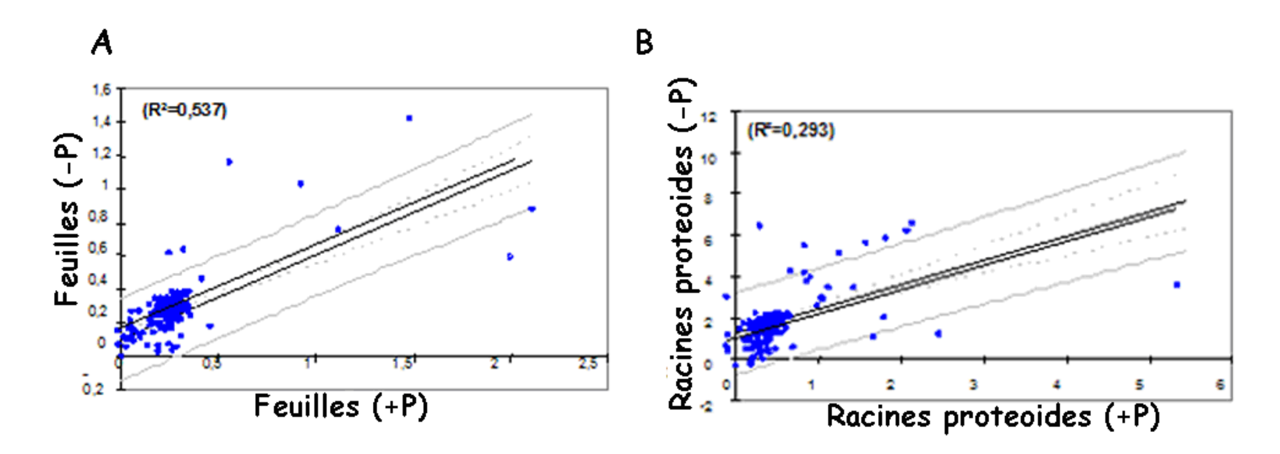


Figure III.1. Courbes de régression linéaire montrant l'analyse de variabilité de l'intensité des signaux.
A et B représentent les moyennes d'intensités des signaux de quatre filtres à ADN indépendants.

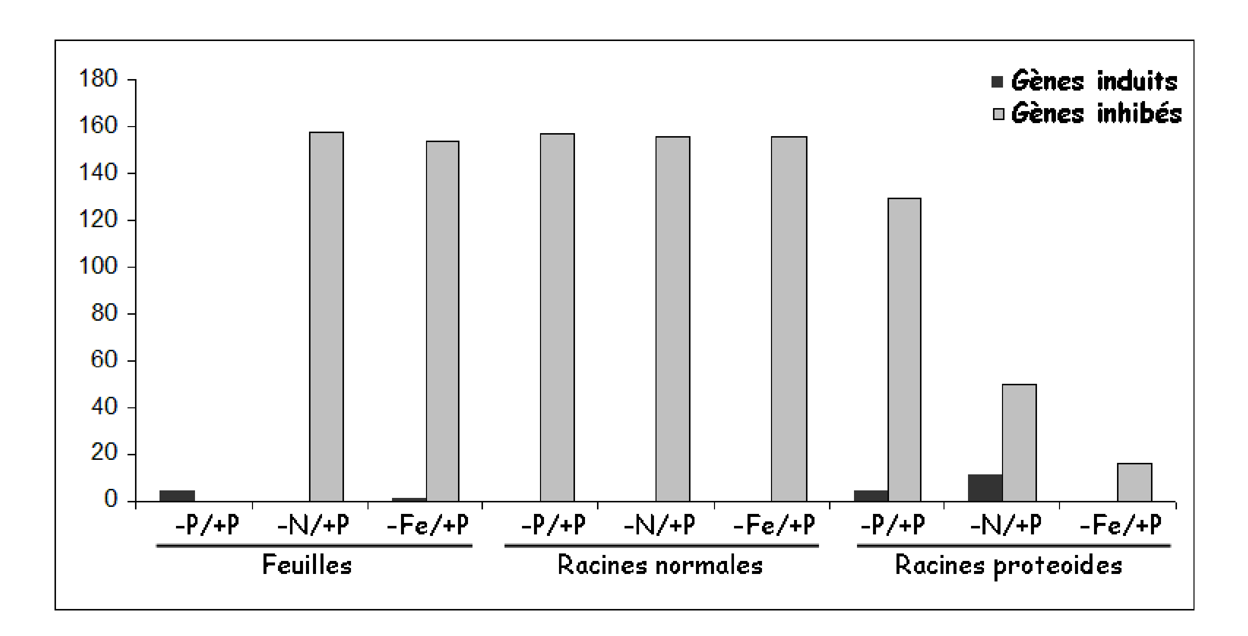


Figure III.2. Comparaison de l'expression des gènes au niveau des feuilles, racines proteoïdes et racines normales du lupin en réponse aux trois stress.

-P: carence en phosphore, +P: présence de phosphore, -N: carence d'azote et –Fe: carence de fer.

Des rapports d'intensités ont été calculés pour vérifier l'expression des gènes en réponse aux différents traitements de stress à savoir, l'absence de phosphore (-P); l'absence d'azote (-N) et l'absence de fer (–Fe) (annexe III.2).

Les gènes ont été considérés comme induits ou inhibés à des valeurs de rapport d'intensités respectivement supérieures à 2 ou inférieures à 0,5. La fréquence des gènes induits et inhibés par organe et selon la condition de stress est résumée dans la Figure III.2. On remarque que dans les conditions de carences: phosphorique, d'azote et de fer l'expression de plusieurs gènes est inhibée au niveau des racines.

Au niveau des feuilles, trois gènes ont été surexprimés en absence de phosphore: *90_F*; *E491_F* et *285_F* et un seul gène stimulé en absence de fer: *90_F*.

Au niveau des racines proteoïdes développées en:

- conditions de carences d'azote, huit gènes ont été surexprimés à savoir: *E080*; *880_F*; *(YPR_005_F11 _092.ab1)*; *(YPR_008_A08 _054.ab1)*; *(YPR_003_A05 _033ab1)*; *(YPR_002_D11 _090.ab1)*; *E598_F* et *E771_F*.
- en condition de carence en fer, 41 gènes ont été surexprimés: *888_F*; *(YPR_011_E05 _036.ab1)*; *(YPR_001_G11 _084)*; *(YPR_013_H02 _016.ab1)*; *E080_F*; *E647_F*; *(YPR_005_E05 _036.ab1)*; *(YPR_008_A04 _022.ab1)*; 889_F; 783_F; *(YPR_002_H07 _060ab1)*; *(YPR_009_C01 _002.ab1)*; *(YPR_008_C12 _087.ab1)*; *(YPR_005_F11 _092.ab1)*; *(YPR_008_A08 _054.ab1)*; *(YPR_009_G07_052.ab1)*; *625_F*; *(YPR_010_H08 _073.ab1)*; *(YPR_003_A05 _033ab1)*; *(YPR_002_D11 _090.ab1)*; *365_F*; *931_F*; *93_F*; *E385_F*; *E392_F*; *735_F*; *1182_F*; *1358_F*; *137_F*; *1425_F*; *E529_F*; *E541_F*; *E545_F*; *E598_F*; *E742_F*; *E745_F*; *E758_F*; *E761_F*; *E771_F*; *E817_F* et *E848_F*.

Par contre au niveau des racines normales aucun gène n'a été stimulé en réponse aux trois types de stress.

Les gènes surexprimés sont présentés dans une matrice d'expression avec un code couleur qui permet de visualiser le degré de cette expression (figure III.3).

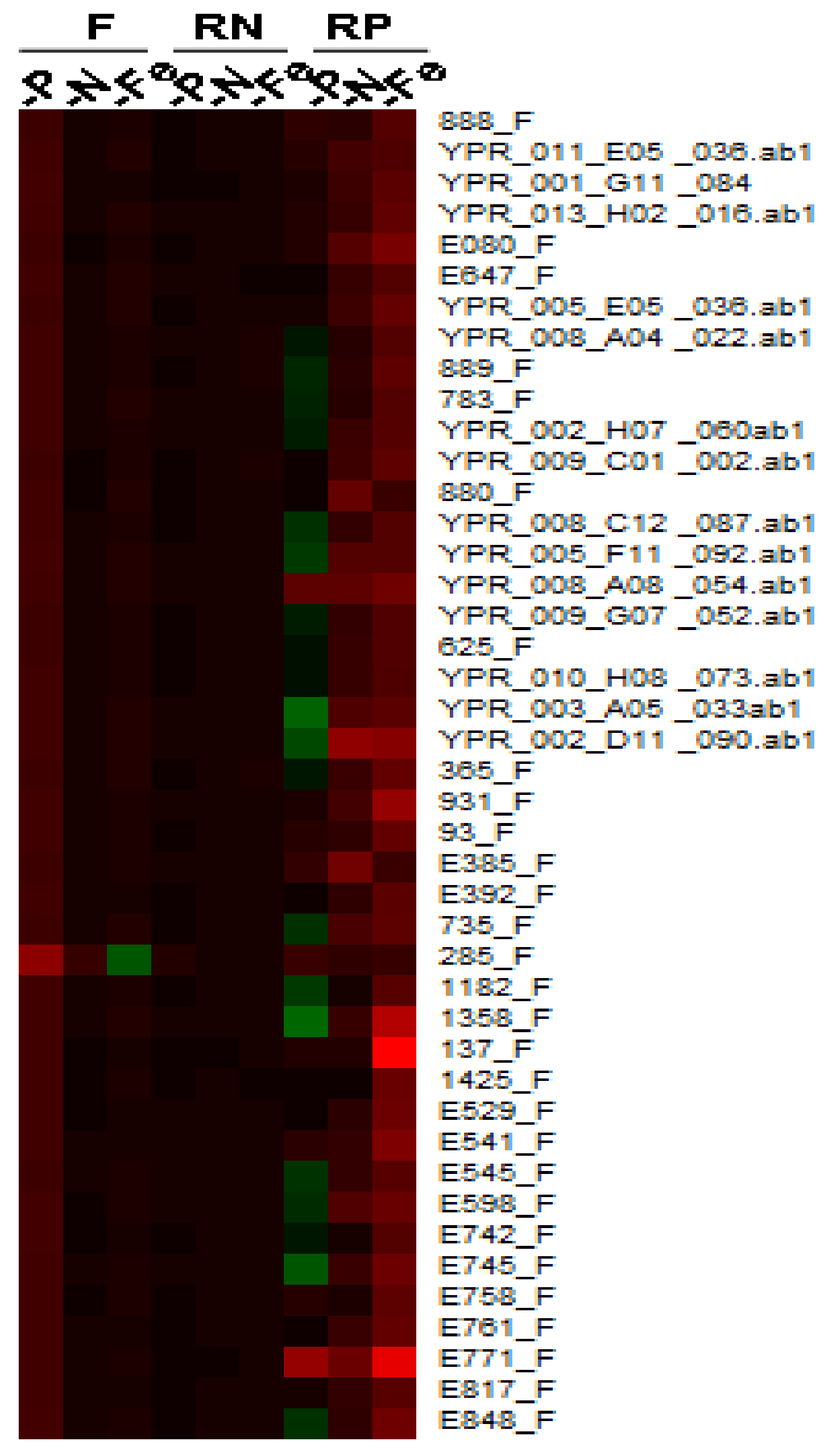


Figure III.3. Matrice représentant l'expression de quelques gènes sur-exprimés (lignes) dans les conditions et tissus analysés (colonne).

F, feuilles. RN, racines normales. RP, racines proteoïdes. –P, condition de carence en phosphore. –N, condition de carence en azote. –Fe, condition de carence en fer. L`échelle des couleurs:

Min = -32.13   0.00   Max = 32.13

Ce résultat est résumé dans le tableau suivant :

Liste des gènes intéressants (surexprimés)

Gène	Numéro d'accession	Description
90_F	CA410642	Tubby
E491_F	CA411197	14-3-3 protein
285_F	CA410024	pfam_AP2_AP2 domain
E080_F	CA410807	Sigma-54 factor, interaction region
880_F	CA410612	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif)
YPR_005_F11_092.ab1	ND	Homeobox
YPR_008_A08_054.ab1	ND	Methyl-CpG binding
YPR_003_A05_033.ab1	ND	
YPR_005_E05_036.ab1	ND	
YPR_008_A08_054.ab1	ND	
YPR_003_A05_033.ab1	ND	
YPR_002_D11_090.ab1	ND	UniRef100_Q2QWI0 RNA polymerase Rpb3/Rpb11 dim
E598_F	CA411302	GmTC219208_"weakly similar to UP|Q948K9 (Q948K9) CmE8 protein, partial (87%)"
E771_F	CA411470	Histone H1/H5
888_F	CA410619	DEAD/DEAH box helicase, N-terminal
YPR_011_E05_036.ab1	ND	
YPR_013_H02_016.ab1	ND	
YPR_001_G11_084.ab1	ND	Pas de similarité
E080_F	CA410807	Sigma-54 factor, interaction region
E647_F	CA411349	HMG1/2 (high mobility group) box
889_F	CA410620	Myb, DNA-binding
783_F	CA410518	
YPR_009_C01_002.ab1	ND	Basic leucine zipper
YPR_008_C12_087.ab1	ND	
YPR_008_A04_022.ab1	ND	
YPR_005_F11_092.ab1	ND	Homeobox
YPR_009_G07_052.ab1	ND	Sigma-54 factor, interaction region
YPR_010_H08_073.ab1	ND	
625_F	CA410353	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
YPR_002_D11_090.ab	ND	UniRef100_Q2QWI0 RNA polymerase Rpb3/Rpb11 dim
365_F	CA410107	Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF
931_F	CA410651	pfam_SRP19_SRP19 protein
93_F	CA410673	UniRef100_Q9FNV1 Somatic embryogenesis related protein [*Dactylis glomerata*]
E385_F	CA411094	UniRef100_Q3AFJ1_TPR domain protein [Carboxydo
E392_F	CA411099	pfam_BTB_BTB/POZ domain
735_F	CA410468	No apical meristem (NAM) protein
1182_F	CA409642	UniRef100_P41152 Heat shock factor protein HSF30 [*Lycopersicon peruvianum*]
1358_F	CA409801	UniRef100_Q6DG70 Zgc:91962 [*Brachydanio rerio*]

Liste des gènes intéressants (sous exprimés/surexprimés)

Gène	Numéro d'accession	Description
137_F	CA409823	StTC127390_"similar to TIGR_Ath1|At5g16780.1 68418.m01965 SART-1 family protein contains Pfam domain, PF03343: SART-1 family, partial (61%)"
1425_F	CA409868	MtTC94757_similar to UP|Q43457 (Q43457) Heat shock transcription factor 34, partial (86%)
E529_F	CA411234	AtTC261385_"UP|ERF4_ARATH (O80340) Ethylene responsive element binding factor 4 (AtERF4), complete"
E541_F	CA411246	GmTC218149_"similar to UP|Q70I27 (Q70I27) SAR DNA-binding protein-like protein, partial (57%)"
E545_F	CA411250	GmTC216457_similar to GB|AAS58510.1|45357102|AY550299 MYB transcription factor {*Arabidopsis thaliana*;} , partial (27%)
E598_F	CA411302	GmTC219208_"weakly similar to UP|Q948K9 (Q948K9) CmE8 protein, partial (87%)"
E742_F	CA411431	LIM, zinc-binding
E745_F	CA411445	SET domain
E758_F	CA411458	GmTC229886_"similar to UP|TAFA_MOUSE (Q8K0H5) Transcription initiation factor TFIID subunit 10 (Transcription initiation factor TFIID 30 kDa subunit) (TAF(II)30) (TAFII-30) (mTAFII30), partial (7%)"
E761_F	CA411462	Histone core
E771_F	CA411470	Histone H1/H5
E817_F	CA411515	GmTC203635_"similar to PIR|T46225|T46225 alpha NAC-like protein - *Arabidopsis thaliana*, partial (71%)"
E848_F	CA411546	TIP49, C-terminal

Note: ND, non déposées dans NCBI

III-1-3 Conclusion

Les résultas des macroarrays obtenus dans le present travail montrent qu'il existe une liste de gènes interessants qui sont potentiellement impliqués dans les stress abiotiques étudiés.

Les macroarrays représentent un outil sans précédent pour étudier le profilage ou l'expression en masse des gènes. Néanmoins, des tests de validation de ces résultats sont bien entendu nécessaires. La validation des résultats du profilage consiste en l'étude de l'expression de chaque gène séparemment et ceci moyennant des tests comme du Northern blot, de la RT-PCR et de la PCR en temps réel.

III-2 Le gène SCARECROW chez le lupin blanc

Partie 1 : Clonage du gène SCARECROW

1-1 Choix d`un EST

A partir d'une banque de facteurs de transcription du lupin nous avons choisi un EST de 1226pb. Cet EST a été retenu du fait de sa grande similarité avec une partie du gène Scarecrow. En effet, la recherche de la nature de cet EST par alignement de sa séquence dans la banque de gènes NCBI a donné le résultat suivant:

Séquences produisant un alignement significatif		Score (Bits)	E Value
dbj|AB048713.1|	*Pisum sativum* PsSCR mRNA for SCARECROW	813	0.0
ref|NM 115282.3|	*Arabidopsis thaliana* SCR (SCARECROW)	668	0.0
gb|AY113991.1|	*Arabidopsis thaliana* putative SCARECROW1	668	0.0
gb|AY080840.1|	*Arabidopsis thaliana* putative SCARECROW1	668	0.0
gb|AY056315.1|	*Arabidopsis thaliana* putative SCARECROW1	668	0.0
gb|U62798.1|ATU62798	*Arabidopsis thaliana* SCARECROW (SCARECROW1)	446	0.0
emb|AL132957.1|ATF24B22	*Arabidopsis thaliana* DNA chromosome 3,	649	0.0

La séquence de l'EST utilisée montre une similarité de 100% et une E-value de " 0 " avec les gènes SCR de *Pisum sativum* et d'*Arabidopsis thaliana*. La séquence de cet EST a été déposée dans la banque de gène sous le numéro d'accession CA411474.

1-2 L`ADN complémentaire (ADNc) de LaSCR1 et LaSCR2

1-2-1 Isolement de l`ADNc des gènes LaSCR1 et LaSCR2

Chez le lupin blanc deux gènes SCR ont été isolés et ont été nommés LaSCR1 et LaSCR2.

1-2-1 a Préparation d`une banque d'ADNc du lupin *blanc*

Une banque d'ADNc a été préparée à partir des racines proteoïdes du lupin cultivé sous stress phosphorique en utilisant le Kit de synthèse d'ADNc (Stratagene, La jalla, CA). Pour ceci, 4µg d'ARN PolyA+ extrait à partir de racines proteoïdes âgées de 7 et 10 jours après émergence

JAE ont été combinés et traités avec l'hydroxyde du méthylmercure. Ensuite, ces ARN ont été utilisés dans la construction de la banque d'ADNc et ont permis d'engendrer 1.6 X10^6 transformants. Cette banque d'ADN a été amplifiée et stockée à -80°C pour plusieurs utilisations.

1-2-1 b Criblage de la banque d`ADNc

Afin d'isoler les ADNc de LaSCR1 et LaSCR2, la banque ADNc des racines proteoïdes a été criblée en utilisant le fragment EST de 1226 pb comme sonde.
Le fragment d'EST a été marqué avec l'isotope radioactif ^{32}P dATP comme expliqué dans l'annexe III.3. La sonde marquée a été utilisée dans le criblage de la banque d'ADNc comme décrit dans le manuel d'instructions du Kit de Lambda ZAPII (Stratagene). Après trois étapes de criblages les clones isolés sont excisés *in vivo* et les inserts sont transférés dans le vecteur pbluescript (Stratagene, USA). La taille des inserts est évaluée par digestion à l'aide de l'enzyme EcoRI et seuls les inserts de grandes tailles sont maintenus pour le séquençage.

1-2-2 Séquençage

Les clones ou inserts obtenus ont été séquencés à l'aide des amorces universelles T3 et T7. A partir des séquences générées d'autres amorces ont été dessinées et utilisées pour déterminer la séquence des clones.

1-2-3 Résultats

1-2-3 a Analyse des séquences ADNc de LaSCR1 et LaSCR2 isolées

Le séquençage a permis de générer une séquence de 2581pb pour l'ADNc de LaSCR1 et une séquence de 2579pb pour l'ADNc de LaSCR2 et qui ont été obtenues après quatre réactions de séquençages. Ces deux séquences ont été déposées dans la banque de gènes NCBI sous les numéros d'accessions FJ236985 (*LaSCR1* cDNA) et FJ236986 (*LaSCR2* cDNA).
Les deux ADNc LaSCR1 et LaSCR2 sont hautement similaires au gène SCR d'*Arabidopsis thaliana*. L'ADNc de LaSCR1 présente un cadre de lecture ouvert (ORF) de 2581pb codant pour une protéine de 776 acides aminés (aa). Aussi, l'ADNc de LaSCR2 présente un ORF de 2579pb codant pour une protéine de 770 aa. La comparaison des deux protéines LaSCR1 et LaSCR2 montre qu'elles sont identiques à 85%.

```
LaSCR1    1  MLSGASNNNT EDGNNNN--- GGSPLTSASN NSSKFSSEEH THSQKLQHSH SGQRKMVRKR  57
LaSCR2    1  ****G***** ***S***NIN ********** ***NI***** **T*Q***** *GK*******  60
AtSCR     1  --------MA *S*DFNG--- *QP*PH*PLR TT*SG**S-- SNNRGPPPPP PPPLV*****  47

LaSCR1   58  MASEMEPTHT MLPHGAVVGG RFPRR--CND DNMSLLLNCS SLPPAVEKTT SFNNNDYHYK  115
LaSCR2   61  ********** ******IDS- *****SSS*N N***SV*I** ********** ****-Y****  118
AtSCR    48  L****S---- ---------- ---------- ---------- ---------- --SNPD*NNS  61

LaSCR1  116  TSSSSKVDNN VAVVPNPTTP NYSTMLLPSS SCSTTINPNY HISQRQQQDQ NQLTSPAVCG  175
LaSCR2  119  *****R**** AH******** ****L***** --******** N*I*T***** **********  176
AtSCR    62  SRPPRR*SHL LDSNY*TV** QQPPS*TAAA TV*SQPN*-- ---------- ----PLS***  105

LaSCR1  176  FSGLPLFPAS QQRNHHHNSS SSSSTGANVE VAASPSMEDN NNN--SAATA WIDGILKDLI  233
LaSCR2  177  ********** ********-- -*T****T** ********** ***NN****D **********  233
AtSCR   106  *****V**SD RG-------- ------*R**M MSVQ*-*DQD SSSSSASPTV *V*A*IR***  151

LaSCR1  234  HSSNSVSIPQ LINNVREIIY PCNPNLAVVL EYRLRLLTSH DNTSAAPNND -----SPNSS  288
LaSCR2  234  ********** **S******* ********** ********** ****T****N NNNNN*S*PA  293
AtSCR   152  ***T****** **Q***D**F ******GAL* *****S*MLL DPS*SS---- -----D*SP-  201

LaSCR1  289  AVGKNNTTEV GVVLNQNHRP LPSTTTTVNV IPDNFPPDPS -GAAPLVMNQ MLSNWVVLPI  347
LaSCR2  294  S*R******* *EG****Q** ***GAN--** MH******S* S****V**** *****G****  351
AtSCR   202  -----Q*F*P LYQISN*PS* PQQQQQHQQQ QQQHK**P*P ---------- -------IQQ  239
                                                                [------
                                                                [------
LaSCR1  348  THDGTSSVVA TALPAHHNDI SHQEECCDIV ATAPDTTRKK KEETRQQKKD EEGLHLLTLL  407
LaSCR2  352  **G*N**MS* *D**T**--- --E******A *NEA****** ***MQG**** *******S**  406
AtSCR   240  QEREN**TD* PPQ*ETV--- --TATVPAVQ TNTAEAL*ER ***IKR**Q* *******T**  294
             ----------------------Leucine heptad I -------------------]
             ----------A-------------]              [------B-----------]
LaSCR1  408  LQCAEAVSAE NLEDANKMLL EISQLSTPFG TSAQRVAAYF SEAISARLVS SCLGIYATLP  467
LaSCR2  407  ********** *V******** ********** ********** ********** ********F*  466
AtSCR   295  *********D *L*E***L** ********Y* ********** ***M****LN *******A**  354
                              [------------------------VHIID------------------
LaSCR1  468  STLVSHSS-H KVASAYQVFN GISPFVKFSH FTANQAIQEA FEREERVHII DLDIMQGLQW  526
LaSCR2  467  **V**----* ********** ********** ********** ********** **********  522
AtSCR   355  *RWMPQTHSL *MV**F**** ****L***** ********** **K*DS**** **********  414
                                               [--------Leucine heptad II---------
             ----------------------]           [-----------A------]    [----B---
LaSCR1  527  PGLFHILASR PGGPPYVRLT GLGTSMEALE ATGKRLSDFA NKLGLPFEFS PVADKVGNLD  586
LaSCR2  523  ********** ********** ********** ***N****** ********** **PH******  582
AtSCR   415  ********** *****H**** *********Q ********** D********C *L*E******  474
             --]
             --]              [-------------------PFYRE---------------------------
LaSCR1  587  PQRLNVTKTE AVAVHWLQHS LYDVTGSDTN TLWLLQRLSP KVVTVVEQDM SNAGSFLGRF  646
LaSCR2  583  LEI***S*** ********** ********** ********A* *********L **********  642
AtSCR   475  TER***R*R* ********** ********AH ********A* *********L *H********  534
             -----------------------------------------]     [--------------------
LaSCR1  647  VEAIHYYSAL FDSLGSSYGE ESEERHVVEQ QLLSREIRNV LAIGGPSRTG DLKFHNWREK  706
LaSCR2  643  ********** *****C**** ********** ********** ********** EF********  702
AtSCR   535  ********** *****A**** ********** ****K***** **V******S* EV**ES****  594
             --------------SAW------------------------------------------]
LaSCR1  707  FQQCGFRGIS LSGNAATQAS LLLGMFPSEG YTLVEDNGIL KLGWKDLCLL TASAWRPPFH  766
LaSCR2  703  L********* ********** ********** ********** ********** **********  762
AtSCR   595  M*****K*** *A*******T ********D* ****D***T* *******S** *****T*RS-  653

LaSCR1  767  PTSAITHHHN                                                     776
LaSCR2  763  T*T**P*S--                                                     770
AtSCR        ----------
```

Figure III. 4. Alignement des séquences de LaSCR1, LaSCR2 et AtSCR.

Les lignes pointillées définissent les cinq domaines fonctionnels (Leucine heptad I, VHIID, Leucine heptad II, PFYRE et SAW).

1-2-3 b Caractérisation des différents domaines fonctionnels des protéines LaSCR1 et LaSCR2

A partir des deux séquences ADNc de LaSCR1 et LaSCR2 les deux protéines correspondantes ont été déduites à l'aide du programme ORF Finder proposé par NCBI. La comparaison des deux protéines montre qu'elles sont divergentes au niveau de leurs parties N-terminale. En comparaison avec LaSCR1 la protéine LaSCR2 présente 60 substitutions, 13 insertions et 14 délétions d'acides aminés au niveau de la partie N-terminale. Par contre, au niveau de la partie C-terminale les deux protéines sont très similaires. Ainsi on note que la protéine LaSCR2 présente en comparaison avec la protéine LaSCR1, 21 substitutions, 1 insertion et 6 délétions d'acides aminés.

L'analyse de ces deux protéines montre qu'elles présentent cinq domaines fonctionnels caractéristiques du gène SCR (Di Laurenzio *et al*. 1996; Pysh *et al*, 1999). Les deux Leucine Heptad Repeats LHRI et LHRII; le motif VHIID; le motif PFYRE et le motif SAW (Figure III.4). La présence des motifs LHRI et LHRII au niveau des protéines de la famille de GRAS suggère que ces protéines peuvent fonctionner comme des multimères (Hurst, 1994; Pysh *et al.* 1999). Chez *A. thaliana* les motifs LHRI, LHRII et VHIID d'AtSCR jouent un rôle dans les interactions protéine- protéine entre SCR et SHORT ROOT (Cui *et al*, 2007).

1-2-3 c Comparaison avec Arabidopsis thaliana SCR (AtSCR)

La comparaison des deux protéines LaSCR1 et LaSCR2 avec AtSCR sur la base des cinq domaines fonctionnels est résumée au niveau du tableau III.4. On note que LaSCR1 et LaSCR2 présentent une similarité faible respectivement de 40,4 et 42 % avec AtSCR au niveau de leurs parties N-terminales (Homopolymeric repeats). Par contre on note une similarité importante de 75,7 et 93,5 % entre LaSCR1/2 et AtSCR sur la base des cinq domaines fonctionnels.

Tableau III.4. Comparaison de LaSCR1 et LaSCR2 avec AtSCR sur la base des domaines fonctionnels et de la partie N-terminale.

Nom de motif	**Similarité avec AtSCR**	
	LaSCR1	**LaSCR2**
Homopolymeric repeat	40,4	42
Leucine heptad I	88,6	86,5
VHIID	93,4	93,4
Leucine heptad II	81,8	75,7
PFYRE	93,4	93,5
SAW	86	87,7

1-2-3 d Comparaison avec d`autres gènes SCR

Une analyse phylogénétique a été performée afin d'analyser les distances génétiques entre les deux gènes SCR du lupin et plusieurs gènes de la famille de GRAS. Ceci inclut les gènes SCR de plusieurs espèces de plantes à savoir *Arabidopsis thaliana* AtSCR (At3g54220); *Zea mays* ZmSCR (AAG13663); *Oryza sativa* OsSCR (BAD22576); *Pisum sativum* PsSCR (BAB39155) et *Pinus sylvestris* PsySCR (ABH85406). Cette comparaison comprend aussi 31 gènes d'*A. thaliana* appartenant à la famille de GRAS. Les sequences des 31 gènes ont été prises du site TAIR (www.arabidopsis.org): AtSCL23 (At5g41920); AtSCL3 (At1g50420); AtRGL1 (At1g66350); AtRGL2 (At3g03450); AtRGL3 (At5g17490); AtGAI (At1g14920); AtRGA (At2g01570); AtSCL28 (At1g63100); AtLAS/SCL18 (At1g55580); AtSCL4 (At5g66770); AtSCL7 (At3g50650); AtSCL26 (At4g08250); AtSCL31 (At1g07520); AtSCL33 (At2g29060); AtSCL14 (At1g07530); AtSCL11 (At5g59450); AtSCL30 (At3g46600); AtSCL9 (At2g37650); AtPAT1 (At5g48150); AtSCL21 (At2g04890); AtSCL5 (At1g50600); AtSCL13 (At4g17230); AtSCL1 (At1g21450); AtSCL8 (At5g52510); AtSCL32 (At3g49950); AtSHR (At4g37650); AtSCL29 (At3g13840); AtSCL6 (At4g00150); AtSCL22 (At3g60630); AtSCL27 (At2g45160) et AtSCL15 (At4g36710).

L'arbre phylogénétique a été élaboré à l'aide du programme MAFFT version 6. L'arbre construit présente une racine (rooted tree) et comprend comme groupe externe (outgroup) un gène humain human STAT (HsSRC; 19 NP004374) (Bolle 2004 and Lim *et al*. 2005).

L'arbre phylogénétique (Figure III.5) montre l'organisation des gènes analysés en 9 clusters: *SCR, DELLA, SHR, SCL3, HAM, SCL4, PAT1, LAS* et *SCL9*. Cette représentation est comparable à celle présentée par d'autres auteurs (Bolle 2004; Lim *et al*, 2005 et Lee *et al*, 2008). On note que les deux gènes LaSCR1 et LaSCR2 sont très similaires aux autres gènes SCR de part leurs position dans le cluster SCR. Le SCL23 positionné dans le cluster SCR a été décrit comme étant le gène de GRAS le plus proche des gènes SCR.

1-2-3 e Analyse fonctionnelle des deux protéines

Les deux protéines LaSCR1 et LaSCR2 ont été analysées à l'aide du programme www.predictprotein.org. Cette analyse a permis de prédire la structure des deux protéines LaSCR1/2 et aussi de révéler la présence de plusieurs motifs (Tableau III.5) synonymes de modifications post-traductionnelle. On note la présence des sites de phosphorylation, de glycosylation, d'amidation et un site pour la leucine zipper. Le site de la leucine zipper est un site de dimerisation commun aux protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes.

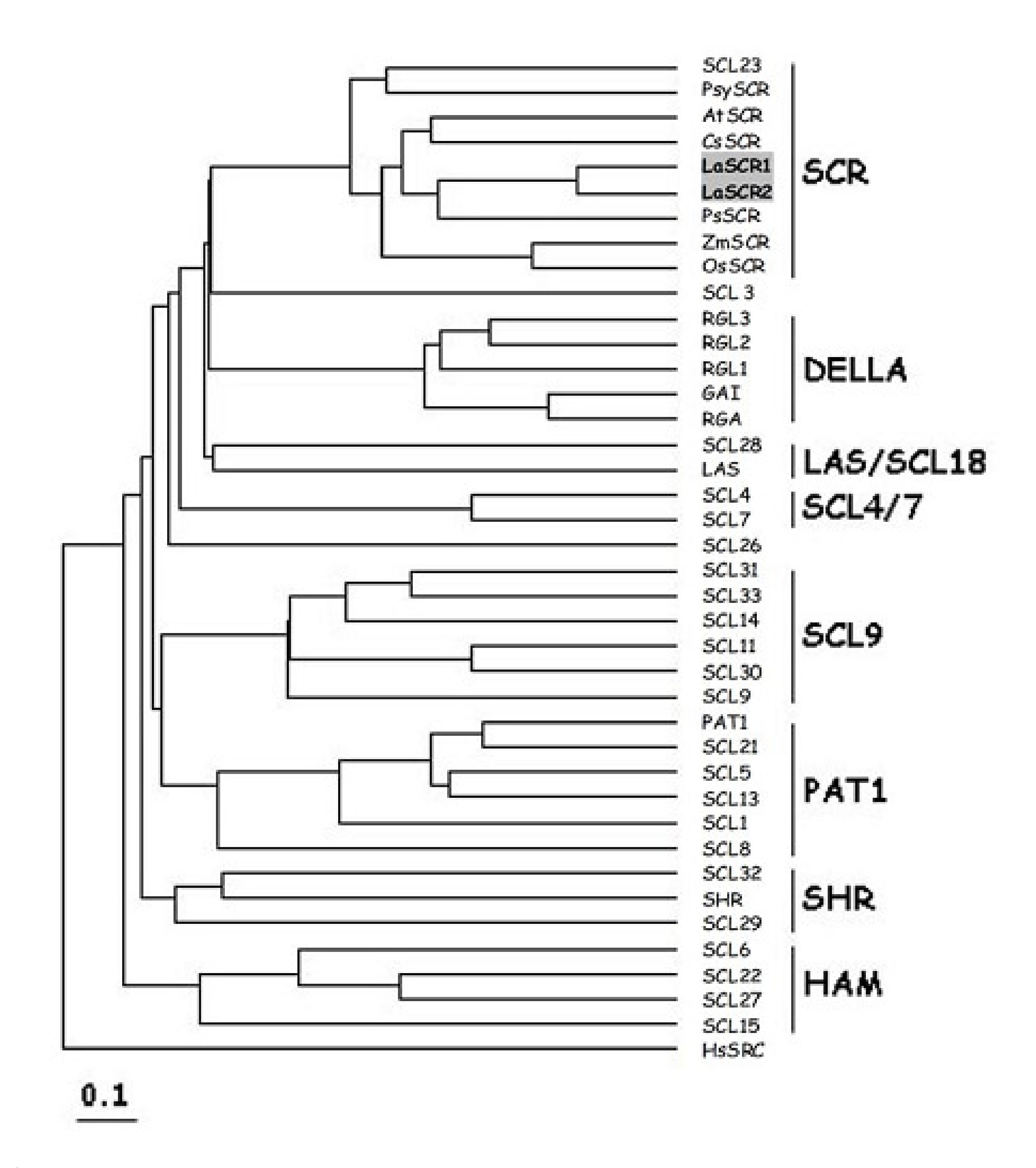


Figure III.5. Arbre phylogénétique de LaSCR1, LaSCR2, les 5 gènes SCR connus et les 31 gènes de la famille de GRAS.

Le gène HsSRC est utilisé comme outgroup. L`échelle indique la distance génétique.

Tableau III. 5. Motifs potentiels présents au niveau des protéines LaSCR1 et LaSCR2

Nom du motif	Position au niveau de LaSCR1	Séquence du Motif	Position au niveau de LaSCR2	Séquence du Motif
Site de la N- glycosylation	8	NNTE	33	NNSS
	27	NNSS	37	NISS
	87	NMSL	94	NMSS
	93	NCSS	142	NYST
	136	NYST	197	NSTS
	193	NSSS	220	NNSA
	217	NNSA	278	NTST
	275	NTSA	290	NNSS
	286	NSSA	301	NNTI
	293	NNTT	359	NSSM
	591	NVTK		
(Site de phosphorylation de protéine dépendante Camp et Cgmp kinase) CAMP_Phospho_site.	560	KRLS	86	RRSS
Site de phosphorylation de la protéine Kinase C (protein kinase C phosphorylation site)	29	SSK	54	SGK
	40	SQK		
	119	SSK	125	SSR
	158	SQR		
	383	TTR	297	SVR
	452	SAR	385	TTR
	457	SHK	454	SAR
	558	TGK	474	SHK
	625	SPK		
Site de phosphorylation de la tyrosine Kinase (TYR_phospho_site)	645	RFVEAIH Y	-	

Tableau III. 5 (suite). Motifs potentiels présents au niveau des protéines LaSCR1 et LaSCR2

Nom du motif	Position au niveau de LaSCR1	Séquence du Motif	Position au niveau de LaSCR2	Séquence du Motif
Site de phosphorylation de la caseine Kinase II (CK2_PHOSPHO_SITE)	39	SSEE	33	SSEE
			60	SEME
	66	SEME	120	SKVD
			211	SMED
	126	SRVD	271	TSHD
			368	SHQE
	212	SMED	379	TAPD
			550	TSME
	274	TSHD	593	TKTE
			606	SLYD
	363	SATD	611	TGSD
	369	THHE	630	TVVE
	549	TSME	663	SYGE
			738	TLVE
Site de N-myristoylation (MYRISTYL)	4	GASNNN	7	GGSNNN
	13	GNNNNG		
	19	GSPLTS	16	GSNNNN
	72	GAVVGG		
	299	GVVLNQ	25	GSPLTS
	461	GIYATL		
	547	GLGTSM	78	GAIDSR
	612	GSDTNT	309	GLNQNQ
	640	GSFLGR	357	GGNSSM
	661	GSSYGE	463	GIYATF
	714	GISLSG	546	GLGTSM
	730	GMFPSE	558	GNRLSD
AMIDATION	558	TGKR	54	SGKR
LEUCINE ZIPPER	548	LGTSMEA LEATGKR LSDFANK L	547	LGTSMEA LEATGNR LSDFANK L

1-3 Structure des gènes LaSCR1 et LaSCR2

1-3-1 Isolement de l`ADN génomique (ADNg) LaSCR1 et LaSCR2

1-3-1 a Préparation d`une banque ADNg du **lupin** *blanc*

Une banque ADNc partielle du lupin blanc a été préparée à l'aide du Kit lambda DASH II/ECORI (Stratagene) comme décrit précédemment par Liu *et al* (2001). A partir de feuilles jeunes de *L. albus*, l'ADN total a été extrait purifié et digéré par EcoRI. Ces fragments digérés sont insérés dans le vecteur de clonage lambda DASHII capable d'intégrer des inserts de 2 à 32 kilobases kb. Les lambda DASH II recombinantes sont clonés dans les souches XL1-Blue-MRA d'*Escherichia coli* et empaquetés dans les bactériophages VCS257 et multipliés pour plusieurs amplifications.

1-3-1 b Criblage de la banque d`ADNg

Les deux fragments ADNc de LaSCR1 et LaSCR2 ont été utilisés et marqués séparément comme sondes pour cribler la banque ECORI de l'ADNg. Le criblage a été réalisé selon les étapes décrites dans le manuel d'instructions du Kit Lambda DASHII (Stratagene). Après trois étapes de criblage, plusieurs clones ont été isolés et l'ADN lambda a été extrait et purifié. Les inserts ont été isolés par digestion du Lambda par ECORI et clonés dans le pbluescript pour faciliter le séquençage et la digestion.

1-3-2 Séquençage

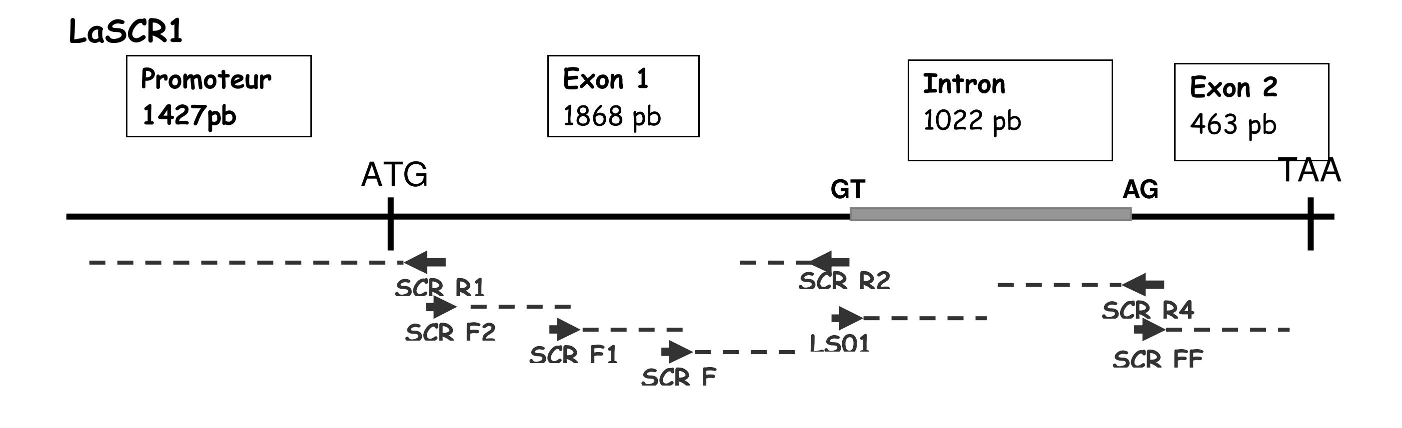
A partir des clones isolés plusieurs réactions de séquençage ont été réalisées comme résumé au niveau des figures III.6 et III.7. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles des ADNc par alignement. Ainsi, la position et la séquence des introns et des promoteurs ont été repérées.

Les séquences obtenues ont été déposées dans NCBI sous les numéros d'accessions FJ236987 (*LaSCR1*) et FJ236988 (*LaSCR2*).

1-3-3 Résultats

1-3-3 a Structure des deux gènes LaSCR1 et LaSCR2 et comparaison avec AtSCR

Les deux gènes isolés présentent deux exons et un intron unique (Figure III.6). Le gène LaSCR1 a un exon 1 de 1868 pb et un exon 2 de 463 flanquant un intron de 1022pb. LaSCR1 a aussi un promoteur de 1427 pb. Par ailleurs, LaSCR2 présente un exon 1 de 1856 pb et un exon 2 de 368 pb et entre les deux un long intron de 2404 pb. Aussi, LaSCR2 présente un promoteur de 1066 pb. On remarque que les deux gènes SCR du lupin présentent les introns les plus longs en comparaison avec les autres gènes SCR connus. Néanmoins la position des introns est très conservée chez tous les gènes SCR y compris les LaSCR1 et LaSCR2.



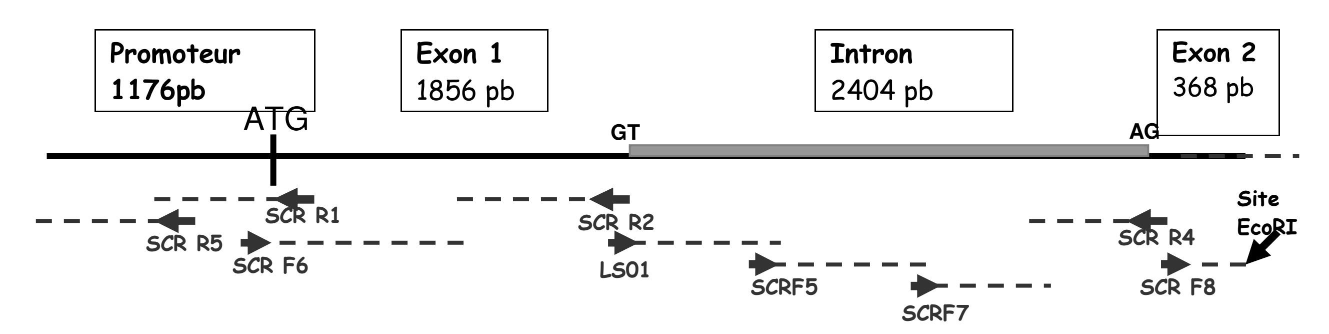


Figure III. 6. Schéma du séquençage du gène LaSCR1 (haut) et du gène LaSCR2 (bas).
Les flèches indiquent la position d'amorces utilisées dans le séquençage.
Les lignes pointillées définissent les séquences obtenues.
Le GT et AG indiquent le début et la fin d'introns.

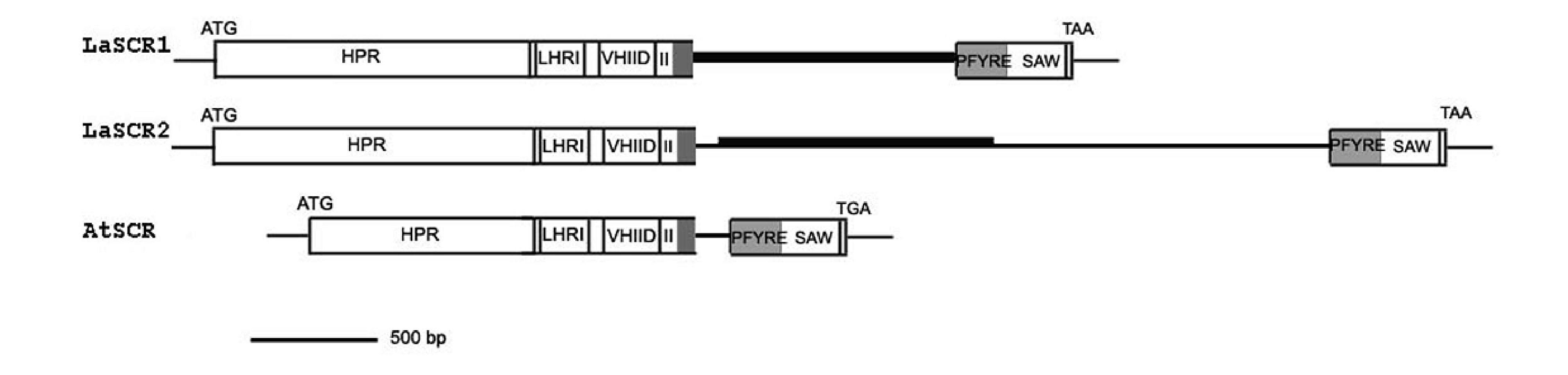


Figure III. 7. Structure des deux gènes LaSCR1 et LaSCR2 en comparaison avec AtSCR sur la base des domaines fonctionnels. *Les rectangles indiquent les séquences codantes. Les lignes indiquent les séquences non codantes. Les lignes en gras représentent les parties des séquences où les deux introns sont très similaires. ATG: codons d'initiations. TAA et TGA: codons stop.*

1-4 Nombre de copies du SCR dans le génome du lupin blanc

Deux southern blots ont été optimisés afin de vérifier le nombre de copies du gène SCR chez Le lupin blanc. Les southern blots ont été préparés avec de l'ADN digéré par EcoRI ou HindIII et ont été soumis à une hybridation par l'ADNc de LaSCR1 ou de LaSCR2 comme sondes. Les étapes de préparation du gel d'ADN et de l'hybridation sont détaillées dans l'annexe III.4. La figure III.8 montre les deux southern blots hybridés respectivement avec l'ADNc de LaSCR1 et de LaSCR2 comme sondes. L'hybridation du premier southern blot avec LaSCR1 comme sonde révèle trois bandes dans le cas où l'ADN est digéré par EcoRI et deux bandes quand l'ADN est digéré par HindIII. La séquence du gène LaSCR1 présente un site de restriction pour EcoRI, ce qui explique la présence des deux premières bandes. Par contre la troisième bande indique qu'il existe chez *L. albus* une deuxième copie du gène LaSCR1.

Par ailleurs, l'hybridation du deuxième northern blot avec LaSCR2 comme sonde révèle une bande unique aussi bien pour les ADN digérés par EcoRI que par HindIII. Ceci montre qu'il existe chez le lupin blanc une seule copie du gène LaSCR2.

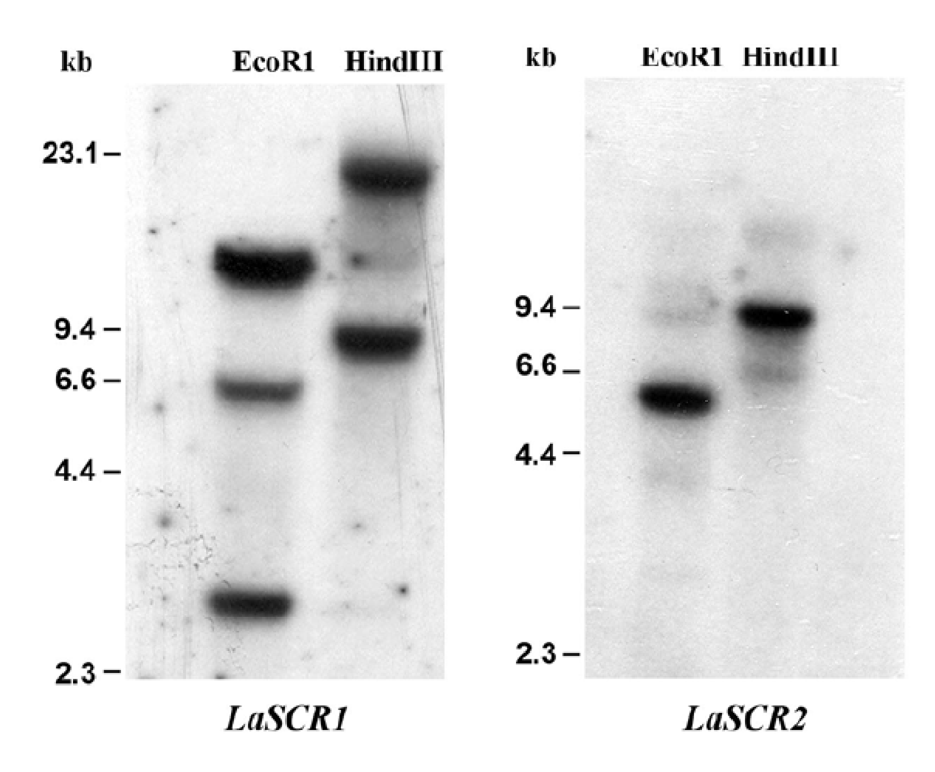


Figure III. 8. Southern blots préparés par l'ADN du lupin blanc digéré par EcoRI ou HindIII et hybridés par LaSCR1 ou LaSCR2.

1-5 Conclusion

Deux gènes SCR, LaSCR1 et LaSCR2, ont été isolés chez le lupin blanc. Ces deux gènes présentent une grande similarité avec AtSCR. Aussi la structure de LaSCR1/2 avec deux exons encadrant un intron unique est similaire à celle des autres gènes SCR. On note aussi que la position de l'intron est conservée entre LaSCR1, LaSCR2 et les autres gènes SCR. Les deux protéines LaSCR1 et LaSCR2 présentent les cinq domaines fonctionnels LHRI, LHRII, VHIID, PFYRE et SAW caractéristiques des gènes de la famille de GRAS. Une étude phylogénétique a été réalisée pour comparer les gènes SCR du lupin aux différents gènes de la famille de GRAS (31) et aux autres gènes SCR connus. Cette analyse montre l'emplacement de LaSCR1 et LaSCR2 dans le groupe SCR. L'ensemble de ces résultats nous permet de définir les deux gènes SCR du lupin LaSCR1 et LaSCR2 comme étant deux orthologues de AtSCR.

Partie 2 : Expression du gène Scarecrow au niveau du système racinaire du lupin blanc

2-1 Matériel végétal

2-1-1 Culture des plantes : système hydroponique

Des plantes de *L. albus* ont été cultivées en conditions de carence phosphorique (-P) et en conditions normales (+P) dans un système hydroponique. Ce système permet aux plantes d'être en permanence en contact avec la solution nutritive. Les plantes sont récoltées à 14 jours après émergence. Les feuilles, les racines normales et les racines proteoïdes sont collectées et mises dans l'azote liquide puis stockées à -80°C. Aussi, plusieurs zones des racines proteoïdes ont été récoltées à savoir la zone 1, la zone 2, la zone 3, la zone 4 et la zone 5. Ces zones correspondent aux différents stades de développement des racines proteoïdes. La Zone 1 définit la pointe racinaire; la zone 2 définit l'émergence des primordia des radicelles à partir de l'endoderme; la zone 3 représente l'élongation des initiales des proteoïdes à travers le cortex; la zone 4 définit les racines proteoïdes non développées alors que la zone 5 correspond aux racines proteoïdes complètement développées (Figure III.9). La zone 5 présente l'état finale et mature de développement des proteoïdes du fait de leurs développement déterminé. Cette expérience à été réalisée en trois répétitions.

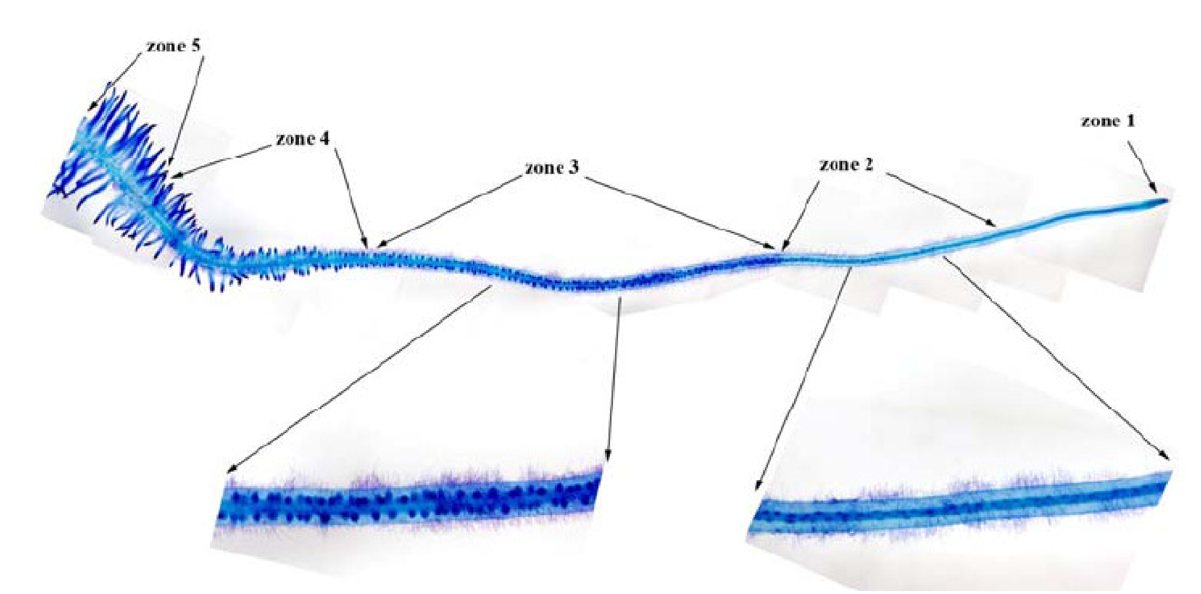


Figure III. 9. Les différentes zones des racines proteoïdes définissants les stades de développement des radicelles.
La racine est colorée au bleu de méthylène et blanchie au chlore.

2-1-2 Extraction de l`ARN

Les ARN ont été isolés à partir des feuilles et racines collectées à l'aide du Kit d'extraction d'ARN, RNAeasy Kit (Invitrogene) et traités à la DNAase selon les instructions du Kit DNA-free (Ambion Inc, Austin, TX, USA). Les ARN ont été quantifiés et stockés à -80°C.

2.1.3 Préparation des ADN complémentaires

Les ARN extraits ont été rétrotranscrits en ADNc en utilisant le Kit de superscript reverse transcriptase (Invitrogene). Ainsi, dans un volume final de 12 µl contenant 1µg d'ARN et 1 µl de primer oligodT les ARN sont dénaturés pendant 5 min à 65˚C et refroidis pendant 10 min dans la glace. A ce mélange on ajoute 5 µL du tampon First Strand 5X; 2 µL de DTT à 0,1 M; 1 µL de dNTP (10 mM), 1 µL d'inhibiteur d'ARNase et 1 µl de la super script reverse transcriptase. La réaction de transcription inverse est optimisée pendant 1 heure à 43˚C. Ce mélange est stocké à -80°C.

2- 2 Effet du stress phosphorique sur le profil d`expression des gènes LaSCR1 et LaSCR2

L'expression des deux gènes LaSCR1 et LaSCR2 au niveau des racines du lupin blanc a été analysée par une retro transcriptase PCR (RT-PCR) et par la PCR en temps réel (qPCR).

2-2-1 Mesure de l`expression par PCR : RT-PCR

La mesure de l'expression de LaSCR1 et LaSCR2 a été réalisée par amplification par PCR des ADNc en utilisant des amorces spécifiques aux deux gènes. Les quantités d'ADNc ont été normalisées en utilisant la tubuline comme standard. Pour LaSCR1 un fragment de 500 pb a été amplifié à l'aide des amorces *LaSCR1-F*, 5`- CAA CAC TAG TGT CCC ACA GTA G-3` et *LaSCR1-R*, 5`- GCTGAGAATCTGGAAGATGC-3`. Dans le cas de LaSCR2 un fragment de 650 pb a été amplifié moyennant les amorces *LaSCR2-F*, 5`- CTCACTCACCTTGGCTTCTCT -3` et *LaSCR2-R*, 5`- CTCAACAGTAGCACCGGTACTAG-3`. La PCR a été optimisée dans 20µl contenant 2µl d'ADNc; 2,5 mM de $MgCL_2$; tampon Gotaq 10X (Proméga); 0,4 mM de dNTPs; 7,5 ng de chacune des amorces et 0,2 µl de Taq polymerase. L'amplification a été réalisée en 27 cycles de 1 min à 94 °C, 30 s à 55 °C et 1 min à 72°C.

La figure III.10 montre qu'il n'y a aucune différence d'expression de LaSCR1 et LaSCR2 dans les conditions de culture en absence ou en présence de phosphore.

On note aussi clairement que l'expression de LaSCR1 est plus élevée que celle de LaSCR2. Au niveau des feuilles, on remarque que l'expression des deux gènes est faible/nulle. Au niveau des différentes zones des racines proteoïdes, on note une expression différentielle. En effet, au niveau des zones avec une activité méristèmatique (zone 1, zone 2 et zone 3) l'expression des deux gènes est importante. Par contre on remarque une diminution de cette expression au niveau des racines proteoïdes développées (zone 5). Cette expression différentielle est liée au rôle du SCR dans la régulation de la division asymétrique. Au niveau des racines normales, on note que l'expression de LaSCR1 est plus importante en conditions de carence phosphorique.

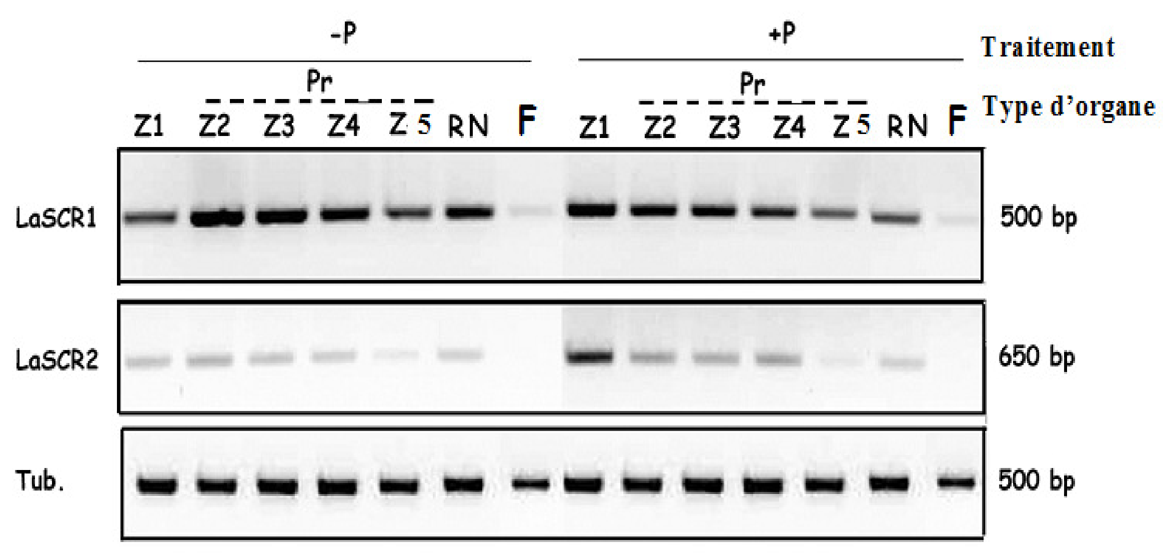


Figure III.10. Expression de LaSCR1 et LaSCR2 au niveau des feuilles (F), des racines normales (RN) et des cinq zones des racines proteoïdes (Pr) en conditions de carence phosphorique (-P) et en conditions normales (+P). *Le marqueur Tubuline (tub.) est utilisé comme transcrit invariant.*

2-2-2 Mesure de l`expression par la PCR en temps réel: Q PCR

Pour optimiser la quantification de l'expression de LaSCR1 et LaSCR2 par la PCR en temps réel, nous avons dessiné des amorces spécifiques pour chacun des deux gènes. Pour LaSCR1 un fragment de 183 pb a été amplifié en utilisant les amorces SCR1F, 5'-ACACTAGTGTCCCACAGTAG-3' et SCR1R, 5'-AACAGTCCTGGCCATTGAAG-3'. De même pour LaSCR2 un fragment de 163pb a été généré par les amorces SCR2F, 5'-TTTCCTCGTCGAAGCAGCAG-3' et SCR2R, 5'-GGGGTTTGGAACAACATGGG-3'. L'amplification a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant le mélange réactionnel ou PCR master mix (iTaq SYBR Green Supermix with ROX, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 5 µl d`ADNc dilué et 40 pmoles de chacune des deux amorces. L'amplification et la détection du signal fluorescent ont été optimisées dans le système de détection de séquences ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Les conditions de l'amplification réalisée ont été de 1 cycle de 2 min à 50°C, 1 cycle de 10 min à 95°C suivis de 40 cycles de 15 s à 95°C et de 1 min à 60°C. L'analyse a été réalisée en trois réplications. Après la fin de la réaction PCR et de l'électrophorèse du gel d'agarose une courbe de dissociation a été optimisée. Cette courbe permet de vérifier la spécificité des produits de la réaction PCR.

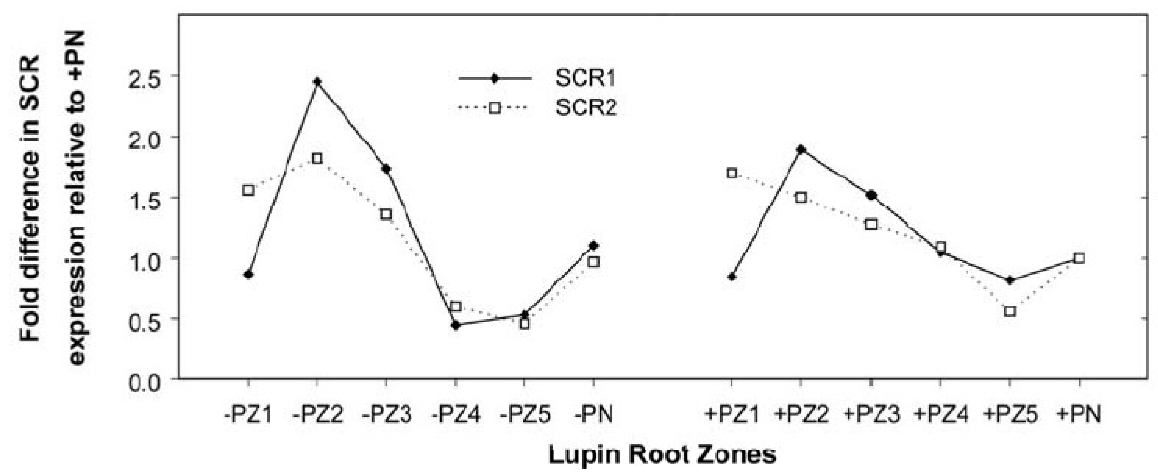


Figure III.11. PCR en temps réel des ADNc générés à partir de racines normales et proteoïdes cultivées en conditions d`absence (-P) ou présence (+P) de phosphore en utilisant des amorces spécifiques de LaSCR1 et LaSCR2.
Les racines normales (+P) sont utilisées en tant qu'échantillons calibres.

A partir des résultats résumés au niveau de la figure III.11. on remarque que l'expression de l'ARNm de LaSCR1 et LaSCR2 est similaire au niveau des plantes cultivées dans les deux conditions d'absence (–P) /présence (+P) de phosphore. Par contre, le profil d'expression des LaSCRs est variable selon le stade de développement de ces proteoïdes. Ainsi, on note qu'indépendamment de la condition de stress, l'expression de LaSCR1 et LaSCR2 augmente au niveau des zones 2 et 3. Ces deux zones caractéristiques de la formation des méristèmes des racines proteoïdes. Par ailleurs, l'expression des deux gènes diminue au niveau des racines proteoïdes matures ou zones 4 et 5. L'expression des LaSCRs au niveau des feuilles n'a pas été détectée (résultats non présentés).

2-3 Conclusion

Les résultats de la RT-PCR et de la PCR en temps réel montrent que les deux gènes SCR s'expriment au niveau des racines du lupin blanc. Cette expression n'a pas été affectée par les conditions de carence phosphorique (-P). Par ailleurs, on note que l'expression de LaSCR1 et LaSCR2 est liée au stade de développement des racines proteoïdes. En effet, l'expression de LaSCRs augmente au niveau des zones racinaires avec des radicelles en développement (zones 2 et 3). Cette expression diminue au niveau des zones 4 et 5 où les racines proteoïdes sont complètement développées. Ces résultats supposent le rôle du SCR dans la régulation de l'activité méristèmatique racinaire chez le lupin.

Partie 3: Expression tissulaire de LaSCR1 et LaSCR2 au niveau des racines de *Lupinus albus* et de *Medicago truncatula*

3.1 Le promoteur pLaSCR2 dirige l`expression du gène LaSCR2

L`étude de l'expression tissulaire d'un gène fait appel aux gènes rapporteurs dont l'activité se traduit par une modification visible de la couleur de la plante l'exprimant. Lors de cette étude le gène rapporteur GUS a été utilisé pour suivre l'expression du gène LaSCR2. Le gène GUS code pour la β-glucuronidase capable d'hydrolyser quelques composés glucoroniques. Ainsi, en présence d'un substrat X-gluc (acide 5-brom-4-chloro-3-indolyl- β- D- glucoronide) la β-glucuronidase conduit à l'apparition d'un produit de couleur bleue (Jefferson, 1989). A partir de dérivés umbelliferyl, la β-glucuronidase libère de l'umbelliférone et permet de mesurer l'activité enzymatique par fluorimétrie. Les plantes ou organes contenant ainsi un gène rapporteur se traduisent par une modification visible de leur couleur quand le gène s'exprime.

3-1-1 Promoteurs LaSCR1 et LaSCR2

3-1-1 a Caractérisation des éléments régulateurs des promoteurs de LaSCR1 et LaSCR2

Les promoteurs de LaSCR1 (1427 pb) et de LaSCR2 (1066 pb) ont été isolés et séquencés comme expliqué dans les résultats de la partie I. Ces séquences ont été analysées pour la recherche des éléments régulateurs ou éléments cis. Deux programmes ont été utilisés pour analyser les deux promoteurs, le PLACE http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/ et le Plant care cis acting regulatory elements http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/. Aussi, plusieurs éléments ont été recherchés manuellement. Les éléments détectés sont listés dans le tableau III.6. L'emplacement de ces éléments est schématisé au niveau des figures III.12 et III.13. Les éléments repérés peuvent être regroupés en éléments de réponse au stress phosphorique comme les TC repeats, Helix loop helix, PHO-like et Nit2 et des éléments liés à d'autres types de stress comme les Binding transcription factor, l'élément Dof, WRKY, Wing finger et PHR1. Plusieurs études rapportent que les gènes codant pour des facteurs de transcription montrent une réponse au stress phosphorique. On nomme les familles MYB, Zinc finger, WRKY, β-HLH, et Nit2 (Mission *et al*. 2005; Graham *et al*. 2006; Muller *et al*. 2007). Les études génétiques qui ont porté sur *Arabidopsis* proposent au moins 4 facteurs de

transcription, *AtPHR1* (famille MYB), *AtWRKY75*, *AtZat6* (zinc finger) et *AtBHLH* impliqués dans le signal du phosphore. Mission *et al*. (2005) ont identifié le P1BS de l'élément *AtPHR1* surexprimé au niveau des promoteurs de plusieurs gènes induits en conditions de stress phosphorique. Par ailleurs, Muller *et al*. (2007) ont repéré le motif AGTTTT qui a été très abondant chez les gènes d'*Arabidopsis* inhibés en réponse au stress phosphorique. Aussi, le motif GAATAT a été surreprésenté chez 16 gènes induits par le phosphore.

Tableau III.6. Les éléments régulateurs détectés au niveau des promoteurs de LaSCR1 et LaSCR2.

Elément	**Séquence**	**Position au niveau du pLaSCR1**	**Position au niveau du pLaSCR2**
TC repeats	TCTCTCT	Aucun	-19
Helix-Loop-Helix	CA(T/G)(A/C)TG	-887, -1393	-611
PHO-like	(G/T/A)(C/T/A)GT GG	-231, -313, -618, -816, -1297	Aucun
Nitrogen regulatory protein 2 (Nit2)	TATC (A/T)(A/T)	-42, -60, -117	-112, -219, -614, -688, -764
BES1	CANNTG	-232, -375, -1113, -1135, -1393	- 88, -201, -452, -611, -813, -1042
Binding transcription Factor	CCAAT	-183, -530, -610, -987	- 664, -777
DNA binding with one finger (Dof) elements	ACTTTA	-760	Aucun
WRKY box	(T)(T)TGAC(C/T)	Aucun	Aucun
Zinc finger	(A/T)GATA(A/G)	-433, -737, -905, -921	-160, -468, -994, -1053
P1BS (PHR1)	GNATATNC	Aucun	Aucun

```
        > Sequence du Promoteur de LaSCR1
                                     HLH/BES1
-1427   CGTGTCACCGTAGTATTATAGATCAGCACCAGATGAATGTACTGAACCGCTCTAAAGACC
                                   BES1
-1367   TTTAGCTTTTAACTCTCTTCAATCAAACACTTGTGTTCTTTTTTCAAAATCTTTTACCTT
             PHO-L
-1307   TTTTTGTGTGGTAAAATGTGATGTTAGTATCCCACCTTCCTTTTCGTCATTGATTTTGGT
-1247   GCCAACTTTTTAGTTTTGTGTCCGATGCACTGTTTGGTTTGACAAAGTTTGCTAATCCCA
-1187   CCAAATTATATAATGAAAAATGAAAAATCACGTATGAAGTCAAGAGGAAAAAGCTGGTTG
                 BES1
-1127   CTGATGCTGCAGTTGAAAGCAAAATGTCAAACGCTACGATTCATATTTTTGGAACATAG
-1067   GTCTGGCAGCTCCTTCTCCTCGTTCGCTGCGTCACTTCTATCACTTATATCACAATTAAT
                        Binding TF
-1007   TTTTCTATCAGTGTCTCCAATGCTCCCATTAAACCGTGTCATTCGATTAAATATAAAAGT
                             Zinc finger     Zinc finger       HLH
 -947   TATAACAACTATAATTTGATTTGATAAATATATGGAGAGATAGAGTTTTAAGAACAGAT
 -887   GATCTGATTATCTCTGTTGCAATTTTTCACCCAAAAGATTTTCTTAAAGTTGTAAAATTA
              PHO-L
 -827   TTTTGAAAGTGGTTTTTTTTGTCCATATCCAGGTTTATATTTTTTATTATATAATTGGA
          DOF                      Zinc finger
 -767   AGACTTTATTTTAAAAATAATGATTTGATAAAAAGTGTCAAAATACTATGACATTCTACT
 -707   AAAGTTAATAGAAAGTTAATTAAGTATAAAAAATTCGTTAGGAAAACAAGGAAACCACAC
                                PHO-L    Binding TF
 -647   ACAAATAAATATATAAATAAATAAAAGTGGTTTCCAATGTATAATTTCCGACAGCAAACA
                                                          Binding TF
 -587   GTAACTAGTGCCTCATATTATATGGAAATAAGTTGGGATGAGCCCTCACTAGCCCAATAG
 -527   TATAATAACATGTATGTCATTAAAAAATATATTCTTATGTGTCTTTTTATTCCCCTTACT
                                     Zinc finger
 -467   AAAACAAAAATAGAATATTATGTTGAGTGAGATAGGATTTGAAAGGAGATCAGATTACAT
                                   BES1
 -407   TTAAAAAATAGTAGCAGTAACGGTAAGCATTTGCAACACATAAATAAAATCAAAATACAC
                                     PHO-L
 -347   AAAGACAAACAAGAAATTGCCAACAAACGGCGTGGTCTCTCGTCGCCCCAACACACCTAT
                                                          BES1
                                                           PHO-L
 -287   TTGTCCCTTTGCATTGGATTGAAGATTGATATTGAGAAGCATCCAAAAGGCAAGTGGCAT
                                                Binding TF
 -227   AGAGAACCGTGATAAAGAAGGGAATCCTATAGCCACTGTCCCAATCTGTTTGGTTACATG
                                                     Nit2
 -167   CTACTAATTCAAAATACACATAACATGGCTTCGATGGGATGTGTTTATCTACCTTCGTGA
                                                  Nit2
 -107   GCAAAAGCTACATAACATATTCAAAACAATTTTACGTATCACTATCAACTATCACTCCCT
        Nit2
  -47   ATCTATCTCACTCTTGGCTTCTCCATAAATTGGATGCTTCTGATGCTATG
```

Figure III. 12. Représentation des éléments régulateurs au niveau des 1427 pb du promoteur de LaSCR1.
Le ATG souligné représente le codon d'initiation de la transcription.

```
> Sequence du promoteur de LaSCR2

-1176  TCTGTCCCGAACCTATAGTACTTAATATAAAAATTAATACATTTATCCGATGTTAGTTCA
                                                               Zinc
-1116  TTCATAGAGGTATTCAGTTTTTTTAGACATCGATGTCATAACTGTATATAGAGTAGTATG
       finger   BES1                                           Zinc
-1056  ATAAAAAAGCATGTGATTTTTTAGCTGTTGTTCTTAATCAATGTCTGGAATCTGGACAGA
       finger
 -996  TAATAGTAAATGTTTGATTAAAATAATTTGTTTAGTAGTGTACTCTGTAGAAGTTAAAAC
 -936  TGGTATAATTTTTCATTACTTTTATGTTATTGTTGATCTTAATTATTATAGGTAAATAAT
 -876  TCAAAATTCGTTGGCTTGGAAACAACTAAACCATATCCAAAAAAAAATGAATGGGGATCA
       BES1                               Binding TF  Nit2
 -816  CTTGTCTCGAATGATGTCTCATTCCCTATCTCGGACCAATGATATATTATCATATAAATA
 -756  AAAGAAATTTTTAAAAAACAAAAAGTGAGATTCTTATTAGTTCGGGACATGGATTAGGAC
          Nit2                    Binding TF
 -696  CAGTATCTACCTCATTCGTGTTGGTTGTCCAATGTATAATTTCCGACCGCAAACAGTAGC
                       Nit2 HLH/BES1
 -636  TAGTAGCTAGTGCCTCATAT CATATGGTAATAAGTAGTCTCTCGATTTCATTTAAAAAAT
 -576  AGCAATAAGAAAATGCTAAGCATGAGCAACAACATACATAAAATCAAAATACACAAAGAC
                                                  Zinc finger
 -516  AAACAACAAATTGACAATAAGTATACCCTTGGCATTGGATTAGAGATAGATCCAAAAGGC
       BES1
 -456  AAATGGCATAGAGAACCGTGTTCAAGCCAGAAAAAAAGGGAATCCTCTTGCCATTGTCCA
 -396  AATCTTCACACCGTTATCTCTTTGGTTATACGCTACTAATTCAAATTACACATAACATTC
 -336  CTTCGCTTCAATGGGATGGGTTTTAGCTAGCTAAGTTAATTATTTGATATAGAGAGGAGG
                                                           Nit2
 -276  AAAAAGTACATAAACATATTAAAAAAAAATTCTACTGTATGAGCTGAACCTATTATCTATT
                 BES1                                     Zinc finger
 -216  GGACATAAATCACATGTATTAAATGACATTATATTTTCCGTCCCAGATTAATGATAATTA
                                                Nit2
 -156  CTTTTTGTTTTAATTTTTTTTTATTTTCTCTATGTAACAATATCATAATAAATTGAACAAC
          BES1
  -96  ATACATGTGATTTATGTCCTTATGTATTACCCATCACTATCACCTATTAATCTATCTCAC
                  TC-Rich
  -36  TCACCTTGGCTTCTCTCTAAAATGGATGCTTGTGCTATG
```

Figure III. 13. Position des éléments régulateurs détectés au niveau des 1176 pb du promoteur de LaSCR2.
Le codon d'initiation est marqué par le ATG souligné.

3-1-1 b Clonage du promoteur LaSCR2 en amont du gène rapporteur GUS

Le but de cette expérience était de cloner une partie du promoteur de LaSCR2 en amont du gène rapporteur GUS préalablement inséré dans le vecteur pBI 101.2. La fusion promoteur pLaSCR2-GUS a été optimisée de façon à avoir les deux codons d'initiation dans un même cadre de lecture. 1Kb du promoteur LaSCR2 (contenant le codon d'initiation et 5 pb de la séquence

codante de LaSCR2) a été amplifié par PCR en utilisant la polymérase KOD qui permet de diminuer les erreurs au cours de l'amplification. Pour ceci, deux amorces spécifiques ont été utilisées et auxquelles nous avons rajouté deux sites de restriction; le site de restriction de l'enzyme SalI ajouté au niveau de l'amorce sens et le site de restriction de BamHI au niveau de l'amorce antisens comme suit:

SCR GUS_F 5' GCA GTC GAC TCT GTC CCG AAC CTA TAG TAC 3'
SalI
SCR GUS_R 5' GCA GGA TCC CTG AGC ATA GCA CAA GCA TC 3'
BamHI

Les fragments amplifiés ont été digérés par SalI/BamHI et clonés dans le plasmide pBI 101.2 (ouvert par digestion avec SalI/BamHI) comme présenté dans la figure III.14. La réussite de l'insertion a été vérifiée par différentes réactions de séquençage en utilisant des amorces spécifiques au promoteur ou au gène GUS. Ces plasmides ont été clonés dans *Escherichia coli*, multipliés et conservés dans du glycérol à -80°C.

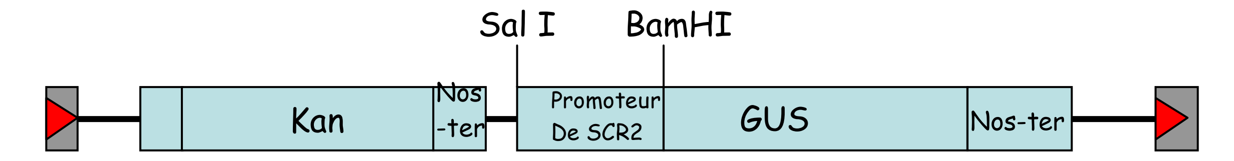


Figure III. 14. Schéma d'une partie du plasmide pBI. 102 avec le promoteur de LaSCR2 inséré en cadre avec le gène rapporteur GUS.
Nos-ter, un site de polyadenylation de la nopaline synthase. Kan, gène de résistance à la Kanamycine.

3-1-2 Préparation de l`inoculum bactérien (*Agrobacterium rhizogenes)*

Les plasmides recombinant pLaSCR2::GUS et les plasmides témoins (pBI 101.2 sans promoteur) ont été électroporés dans deux souches d'*Agrobacterium rhisogenese* électro compétentes. La souche A4T pour la transformation de *L. albus* et la souche Arqual pour la transformation de *Medicago truncatula*. Les cellules *d'A. rhizogenese* ont été cultivées sur milieu trypton- yeast (TY) additionné d'acetosyringone 100 mM et de glucose 1%. Aussi, un antibiotique est ajouté selon la souche d'*Agrobacterium* utilisée, la Rifampicine (100 mg/ml) pour la souche A4T et la

Streptomycine (50 mg/ml) pour la souche Arqual. Les cellules sont cultivées pendant 2 jours à 30°C. Ces cellules sont immédiatement utilisées pour transformer les racines de *L. albus* ou *M. truncatula*.

3-1-3 Test histochimique de l'activité ß-glucuronidase (GUS)

3-1-3-1 Activité du pLaSCR2::GUS au niveau des racines transgéniques du lupin blanc

3-1-3-1 a Préparation et transformation des plantes par injection

Les plantes destinées à la transformation génétique subissent un traitement de pré-transformation particulier. Les surfaces des graines du lupin sont stérilisées 10 min avec de l'éthanol à 90% et rinçées 3 fois à l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite placées dans de l'eau de javel à 10% (v/v) et rincées 3 fois avec de l'eau distillée. Les graines sont mises en germination à l'obscurité et sur un milieu d'agarose (0.6%). Après que les radicelles aient atteint une longueur de 10 mm, les plantules sont transférées sur de la vermiculite imbibée d'eau et laissées germer à l'obscurité et à température ambiante pendant 3 jours. Les plantules sont ensuite mises à croître 2-3 jours de plus en présence de la lumière et à + 4°C. Ainsi les plantules deviennent prêtes à la transformation génétique. Une solution d'*Agrobacterium* (la culture d'*A.r* avec le vecteur recombinant d'intérêt, diluée dans 2ml d'une solution de phosphate buffered saline PBS), est injectée au niveau de l'hypocotyle des plantules préparées à l'aide d'une aiguille de ponction de 25ga. Les plantes sont ensuite mises en culture dans la chambre de culture selon les conditions décrites précédemment. Après 3 semaines de culture les racines non transformées (en dehors des sites d'injection) sont enlevées et les plantes sont remises dans une vermiculite fraiche en s'assurant que les racines transgéniques sont bien couvertes. Après 2 semaines, les plantes sont récoltées et seules les racines chevelues (hairy roots) émergeant des points d'injections sont collectées.

3-1-3-1 b Préparation et transformation des plantes par trempage racinaire

Les gaines du lupin destinées à la transformation par trempage racinaire sont aussi traitées à l'éthanol/chlore et mises en germination sur un milieu d'agarose comme décrit précédemment. Les plantules avec des radicelles de 10 mm de long sont transformées dans des conditions

stériles. Ainsi, 3 mm des pointes des radicelles sont coupés avec un scalpel et les bouts des radicelles sont trempés dans la culture d'*A.rhizogenese* contenant le vecteur recombinant d'intérêt préparé. Six plantules sont ensuite mises en culture sur des boites claires de 222 X 222 mm (Genetix USA Inc., Boston, MA, USA) contenant 200 ml d'agarose inclinée (0.6% dans la solution Hoagland ou solution nutritive) additionnée de Kanamycine 15 mg 1^{-1}. La kanamycine est utilisée pour sélectionner les racines transgéniques. Les boites sont ensuite placées verticalement dans la chambre de culture selon les conditions de température/lumière décrites précédemment. Après 3 semaines, environ 50 % des plantes développent des racines chevelues (racines émergeant des points de sections). Les plantes seront transférées sur un milieu fraichement préparé et remises en culture pour 2 semaines de plus. Seules les racines chevelues sont collectées et utilisées.

3-1-3-1 c Localisation de l`expression du promoteur LaSCR2

Les racines normales et proteoïdes transformées ont été incubées à 37°C dans une solution de coloration 5-bromo-4-chloro-3 indolyle glucuronide (X-gluc) (annexe III.7). L'activité glucuronidase révélée par la coloration bleue a été observée après 20 minutes d'incubation. Les racines ont été maintenues dans la solution X-gluc pendant 60 min à 90 min de plus. Les racines bleues ont été transférées dans une solution d'eau pour arrêter la réaction de coloration. Les tissus ont été observés sous microscope électronique.

Au niveau des racines normales, l'expression du transcrit LaSCR2 a été localisée au niveau de l'endoderme et au niveau du centre quiescent (Figure III.15). Les plantes témoins transformées avec le plasmid pBI sans promoteur ne montrent aucune coloration GUS. Ce profil d'expression au niveau de l'endoderme et le centre quiescent est caractéristique du gène SCR. En effet, le gène SCR présente le même profil d'expression chez plusieurs espèces de plantes (Malamy & Benfey 1997; Lim *et al*. 2000; Sassa *et al*. 2001; Kamiya *et al*. 2003 et Laajanen *et al*. 2007).

La coloration de GUS (bleue) a été localisée aussi au niveau des racines proteoïdes à différents stades de développement (Figure III.16). On note que l'expression du LaSCR2 est observée depuis le développement des premières cellules méristematiques des proteoïdes. La coloration du LaSCR2-gène rapporteur a été marquée au niveau des radicelles en cours d'élongation et aussi au niveau des racines proteoïdes complètement développées. Le profil d'expression du LaSCR2 au

niveau des racines proteoïdes est similaire à celui des racines normales. En effet, l'expression du LaSCR2 promoteur:: GUS a été détectée au niveau de l'endoderme des proteoïdes.

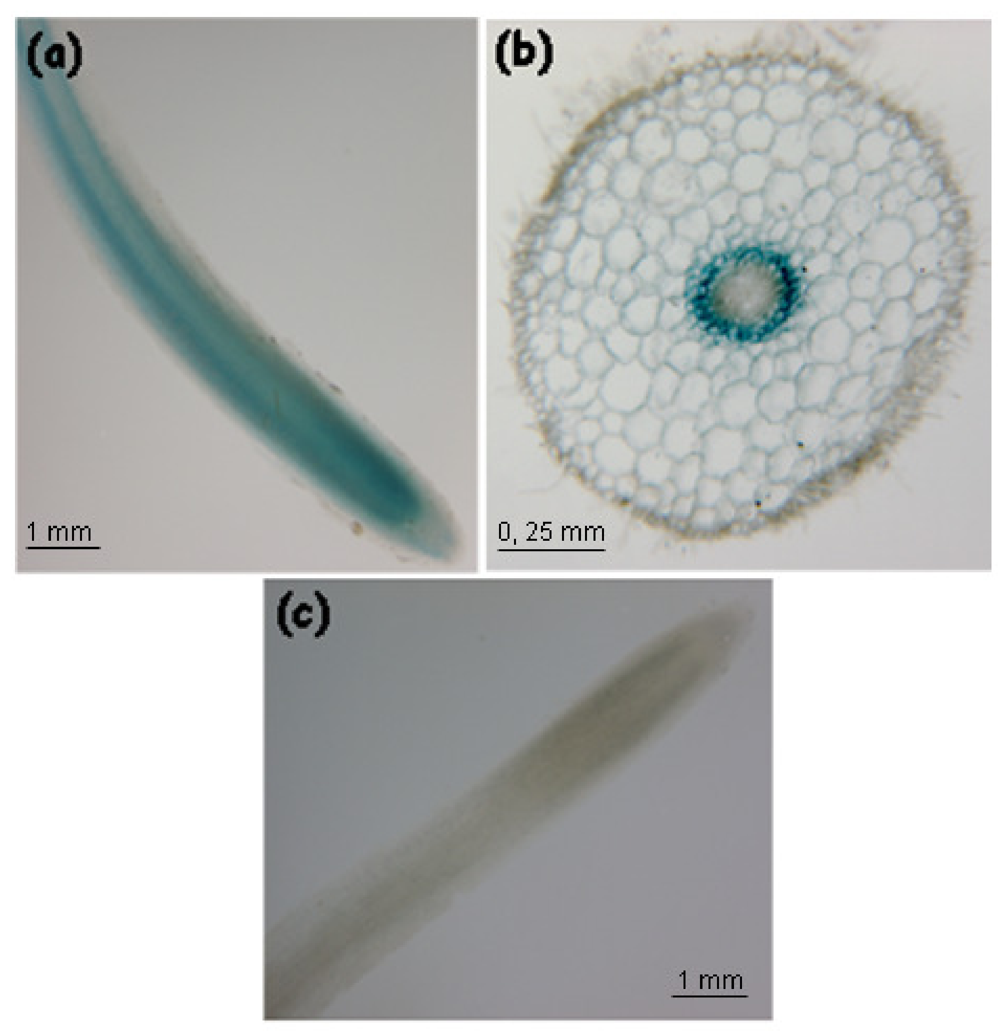


Figure III.15. Expression du promoteur de LaSCR2 dirigée par le gène rapporteur GUS au niveau des racines normales du lupin blanc.

Expression de LaSCR2 détectée au niveau de l'endoderme des racines normale en coupe transversale (a) et longitudinale (b). (c) Racine témoin.

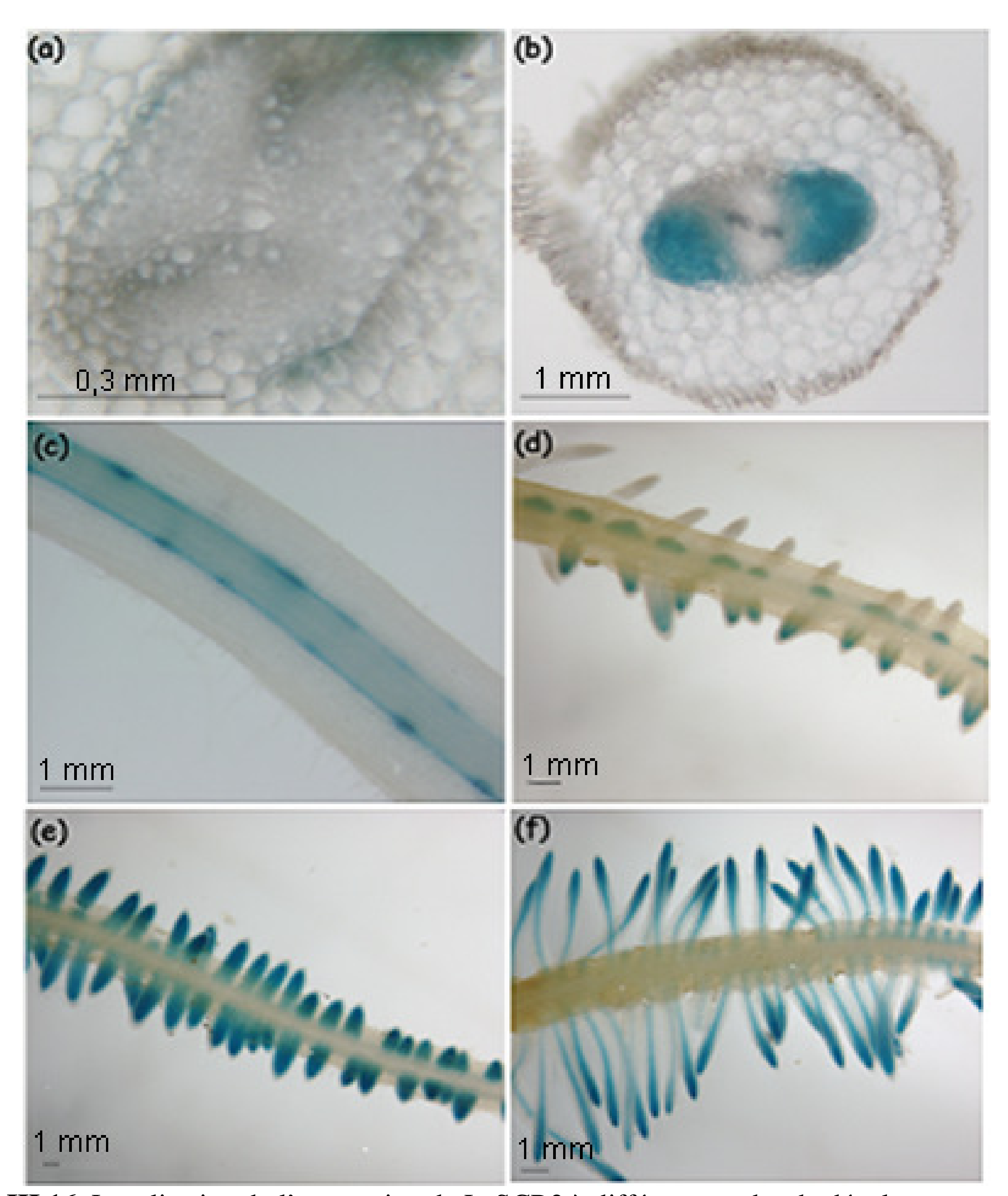


Figure III.16. Localisation de l'expression de LaSCR2 à différents stades de développement des racines proteoïdes.

(a) Localisation du transcrit de LaSCR2 au niveau des primordia des proteoïdes. (b) Coloration bleue de GUS au niveau des radicelles en développement à travers le cortex. (c) Coupe longitudinale montrant la localisation du transcrit de LaSCR2 au niveau de l'endoderme et des initiales des proteoïdes. (d), (e) et (f) Racines proteoïdes en développement et matûres.
La coloration bleue est visible au niveau de l'endoderme et à travers le centre quiescent des proteoïdes non totalement développées.

3-1-3-2 Activité du pLaSCR2::GUS au niveau des racines transgéniques de *Medicago truncatula*

Le promoteur de SCR du lupin a été utilisé pour analyser l'expression du SCR chez *Medicago truncatula*. *Medicago* se prête aisément à la transformation avec des gènes du lupin.

3-1-3-2 a Préparation et transformation des plantes par trempage

La surface des graines de *M. truncatula* a été stérilisée avec de l'acide sulfurique absolu pendant 6 min et rinçée 7-8 fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite incubées 2 min dans du chlore et rapidement rinçées avec de l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite incubées dans de l'eau distillée stérile pendant 2-5 jours à l'obscurité et à +4°C. L'eau est changée chaque jour. Les graines sont ensuite prégermées sur boites de pétri contenant de l'agar (1%). Les boites sont inversées et incubées pendant 24-30h à l'obscurité et à température ambiante. Les plantules avec des radicelles de 1cm de long sont idéales pour la transformation. Ainsi, et dans des conditions stériles, 3 mm des pointes des radicelles sont coupées et trempées dans la solution d'*Agrobaterium* avec le vecteur recombinant d'intérêt. Huit plantules sont ensuite transférées sur des boites claires de 100X100 mm contenant du milieu Fahraeus modifié (voir annexe III.5 pour la composition) et additionné de 27.5 µg/ml de kanamycine. Les boites sont ensuite incubées verticalement dans une chambre de culture avec 21°C et 16h/8h de lumière/obscurité. Les racines chevelues apparaissent après une durée de 7-10 jours. Par ailleurs, la collecte des plantes se fait après 14-21 jours de culture en s'assurant que les racines transformées ont atteint 1.5-2 cm de long. Seules les racines transformées et supposées être transgéniques sont récoltées.

3-1-3-2 b Localisation de l`expression pLaSCR2 ::GUS

L'expression du promoteur de LaSCR2 dirigée par le gène rapporteur GUS au niveau des racines de *Medicago* présente un profil très similaire à celui obtenu pour le lupin. La coloration GUS a été très marquée au niveau de l'endoderme des racines primaires et aussi des racines latérales (Figure III.17). Le transcrit de LaSCR2 a aussi été observé au niveau des méristèmes des racines latérales.

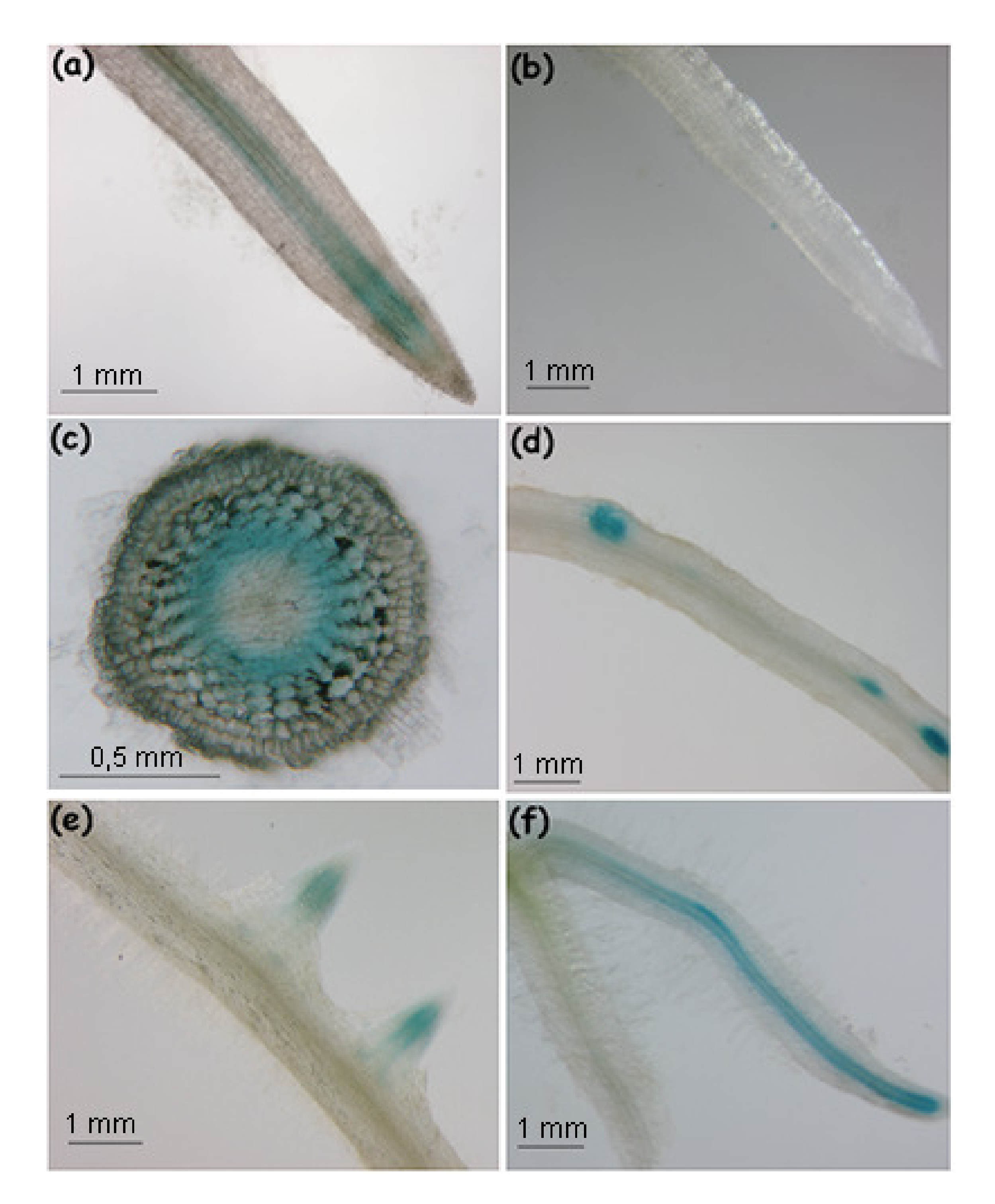


Figure III. 17. Localisation de l'expression du SCR dirigée par GUS au niveau des racines de *Medicago truncatula*.

(a) Expression au niveau de l'endoderme à travers le centre quiescent. (b) Racine témoin. (c) Coloration de GUS au niveau de l'endoderme en anneau (coupe transversale). (d) Expression du transcrit de SCR au niveau des initiales des racines latérales. (e) et (f) Localisation du transcrit de SCR au niveau des racines latérales.

3-2 L`hybridation *in situ* du LaSCR1 chez le lupin blanc

Une hybridation *in situ* a été performée afin de déterminer la localisation cellulaire du transcrit de SCR au niveau des pointes racinaires du lupin blanc.

3-2-1 Traitement des tissus

Des racines du lupin cultivé dans le sable et selon les conditions décrites précédemment sont collectées. Des fragments de 0,3 à 0,5 mm de la pointe racinaire sont coupés avec un scalpel. Les tissus sont fixés dans une solution contenant du paraformaldehyde 4%, glutaraldehyde 0.25%, Tween-20 0.05% et du phosphate de sodium 50mM (PH 7.2). La fixation est optimisée sous vide pendant 2 à 3 min. Les tissus sont placés à 4°C pendant 12 à 20h. La deuxième étape de la préparation des tissus consiste à remplacer l'eau des tissus par de la résine. Ceci, permet de sectionner convenablement les tissus. Lors de la déshydratation, l'eau des tissus sera remplacée progressivement par des solvants organiques hydrophobes (dans ce cas le xylène). Ces solvants permettent de solubiliser la résine ou cirre (paraffine) et d'assurer sa pénétration dans les tissus. Ces derniers sont ensuite sectionnés dans les blocs de paraffine. Les sections de 10 µm d'épaisseur obtenues sont fixées sur des lames prétraitées avec un adhésif (Poly-lysine) pour éviter la perte des tissus au cours de l'hybridation.

3-2-2 Utilisation de sondes froides: digoxigenine

Les sondes marquées ont été préparées à partir des ADNc de LaSCR1 (de +1224pb à +2292pb) correspondant aux domaines les plus conservés du gène SCR à savoir la Leucine heptad I and II, VHIID et une partie importante du motif PFYRE. Le fragment de LaSCR1 choisit présente 93% d'identité avec l'ADNc de LaSCR2. Ce fragment de 1068 pb a été amplifié à l'aide des deux amorces, la SCR-F, 5'-CAATGTGCTGAAGCAGTTTCAGC-3' et la SCR-R, 5'-GGGAGGTTCTCCAGCAGAAAG-3'. Ce fragment a été soumis à une ligation avec le vecteur pGEMTeasy (Promega, Madison, WI, USA) et ensuite cloné dans le vecteur pBSSK+ pour une utilisation dans le marquage digoxygenine (DIG).

Les sondes d'ARN marqué- digoxigenine ont été générées dans les deux orientations sens (témoin) et anti-sens (expérience). Ceci a été performé selon une transcription *in vitro* en utilisant le nucléotide marqué DIG-11-UTP (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Les sondes d'orientation sens permettent de vérifier que la coloration obtenue est liée à l'hybridation spécifique de la sonde avec les ARNm et non pas à un artéfact.

3-2-3 Hybridation

La sonde préparée est prétraitée pendant 10 min à 80°C dans une solution de DTT 3M; ARNt 10µg/µl et polyA 20µg/µl. L'hybridation des tissus et de la sonde marquée est réalisée pendant 12 à 20 h et à 42°C dans un tampon contenant: la sonde traitée; le formamide; le NaCl 5M; le Tris-Cl 100mM PH 7.5; le Denhardt's 50X; le sulphate dextran 50% (v/v) et le DTT 3M. Les lames sont ensuite soumises à une série de lavages. 5 à 10 min à température ambiante dans une solution de SSC 5X et DTT 5M; 30 min à 37°C dans de l'ARNase 0,5µg/ml et 30 min à 37°C dans de l'ARNase 0,5µg/ml et DTT 5mM. Un dernier lavage est assuré dans du SSC 2X et DTT 1mM pendant 30min et à température ambiante.

3-2-4 Résultats

La détection immunologique a été réalisée à l'aide du Kit de détection 'DIG Nucleic Acid Detection Kit' (Roche Applied Science) et selon les instructions données.

L'anticorps anti-DIG a été utilisé à la concentration de 1:100 et pour incubation de 12 à 20h. Le signal a été détecté en utilisant la phosphatase alcaline de substrats NITROBLUE tétrazolium et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl18 phosphate. La figure III.18 résume les résultats obtenus. On remarque que l'expression du LaSCR1 a été observée au niveau de l'endoderme et du centre quiescent de la pointe racinaire du lupin. Les échantillons témoins hybridés par les sondes de LaSCR1 sens ne montrent aucun signal. Cette expérience a été confirmée deux fois.

Une expérience similaire a été menée sur les racines proteoïdes afin de vérifier l'expression du LaSCR1 à ce niveau. Les ARNm du LaSCR1 ont été détectés au niveau de la couche d'endoderme des racines proteoïdes avec un profil similaire à celui observé pour les racines normales.

Le profil d'expression du LaSCR1 obtenu au niveau des racines normales et proteoïdes du lupin est similaire à celui observé chez plusieurs espèces de plantes à savoir *A. thaliana* (Malamy & Benfey 1997); *Zea mais* (Lim *et al*. 2000; 2005); *Pisum sativum* (Sassa *et al*. 2001); *Orisa sativa* (Kamiya *et al*. 2003) et *Pinus sylvestris* (Laajanen *et al*. 2007).

Nous avons aussi observé une diminution de l'expression de LaSCR1 au niveau des cellules filles du cortex des racines normales. Ce profil d'expression a été aussi observé chez le riz (DiLaurenzio *et al*. 1996; Kamiya *et al*. 2003).

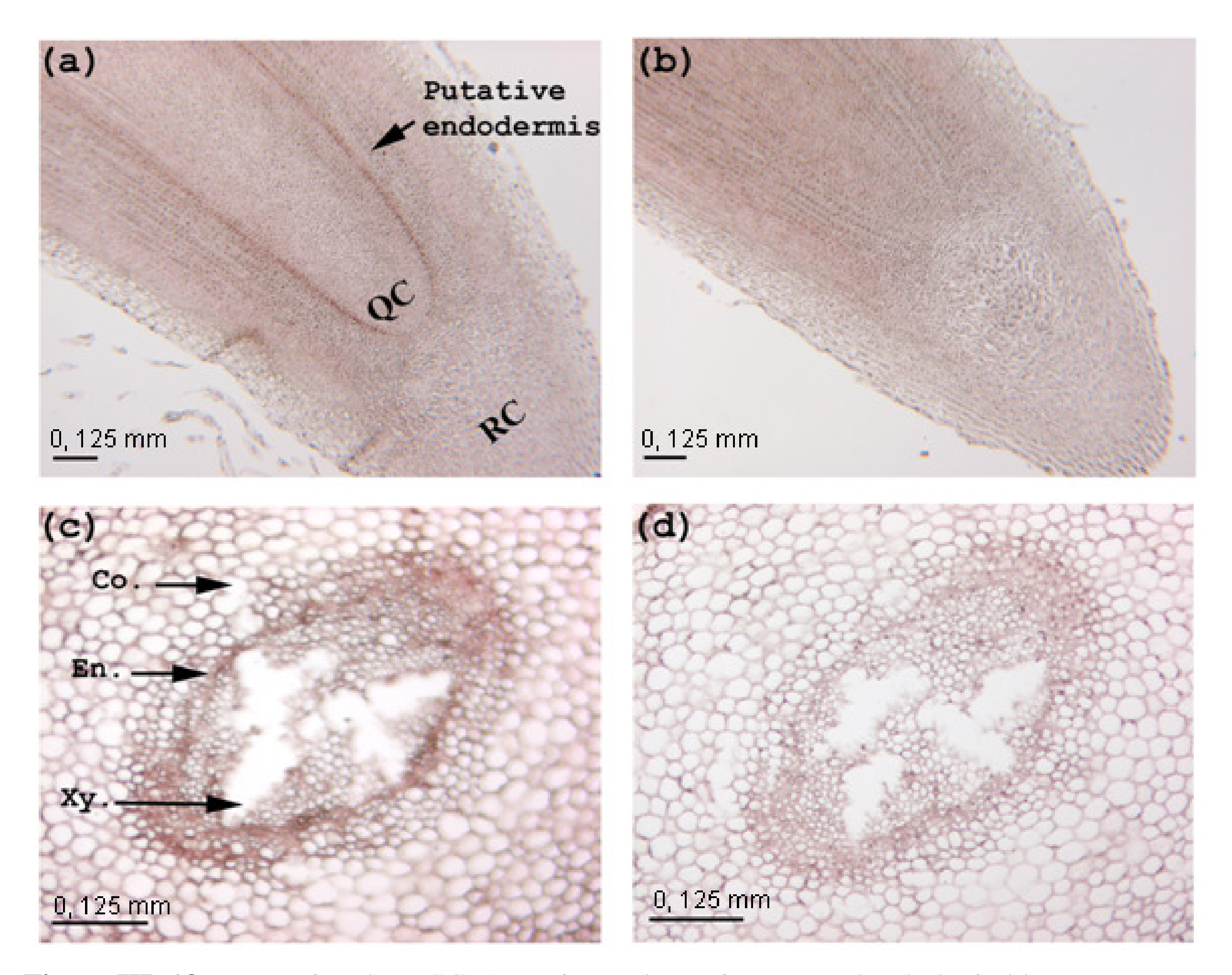


Figure III. 18. Expression du LaSCR1 au niveau des racines normales du lupin blanc.

Le transcrit de LaSCR1 localisé au niveau de l'endoderme en coupe longitudinale (a) et transversale (c). Echantillon témoin sans aucun signal, en coupe longitudinale (b) et transversale (d).
QC, centre quiescent; RC, cap racinaire; Co, cortex; En, endoderme; Xy, xylème.
Les sondes ont été marquées par la digoxigenine (DIG)-11-UTP.

3-3 Conclusion

L'expression tissulaire du SCR au niveau du système racinaire du lupin a été abordée par deux moyens. L'expression du LaSCR1 et la localisation des ARNm a été analysée par une hybridation *in situ* des racines normales et proteoïdes avec une sonde de LaSCR1 marquée par la digoxigenine (DIG)-11-UTP. L'expression du LaSCR2 au niveau des racines du lupin et de la luzerne en utilisant le promoteur de LaSCR2 lié au gène rapporteur GUS.

L'expression des deux gènes LaSCR1/2 a été localisée au niveau de la couche d'endoderme et au niveau du centre quiescent.

L'expression du SCR au niveau des racines du lupin et de *Medicago* a été très précoce et a été observée depuis la formation des primordia des racines normales et proteoïdes. Cette expression a été observée au niveau de tous les stades de développement des proteoïdes et a été très marquée au niveau des racines proteoïdes matures. Le profil d'expression du SCR au niveau deux espèces étudiées a été similaire à celui observé chez d'autres espèces végétales (Malamy & Benfey 1997; Lim *et al*. 2000; Sassa *et al*. 2001; Kamiya *et al*. 2003; Laajanen *et al*. 2007). Nous avons aussi détecté une réduction de l'expression de LaSCR1 au niveau des cellules filles du cortex comme cela a été observé chez le riz (DiLaurenzio *et al*. 1996; Kamiya *et al*. 2003).

L'expression du SCR au niveau de l'endoderme constitue un mécanisme très conservé entre l'ensemble des espèces étudiées jusque là. Ceci peut aussi expliquer qu'il excite toujours une seule couche d'endoderme chez les plantes. Néanmoins cette hypothèse reste à prouver.

Partie 4: Analyse de la fonction du gène SCR

4-1 ARN d`interférence ARNi: Silençage du SCR

4-1-1 Préparation du vecteur LaSCR1i::ARNi

4-1-1 a. Choix de la séquence du gène à *utiliser*

Un fragment de l'ADNc de LaSCR1 de +1875 pb à +2338 pb correspondant à la partie la plus conservée du gène a été amplifiée à l'aide des amorces LaSCR1i-F, 5'-AAGCTGTTGCTGTCCATTGG-3' et LaSCR1i-R, CAACCAAGTTTGAGGATGC-3'.

Ce fragment a été introduit en orientation sens et antisens dans le vecteur pHellsgate 8 (Helliwell *et al.* 2002) induisant l'ARNi en utilisant le système GATEWAY (Invitrogen).

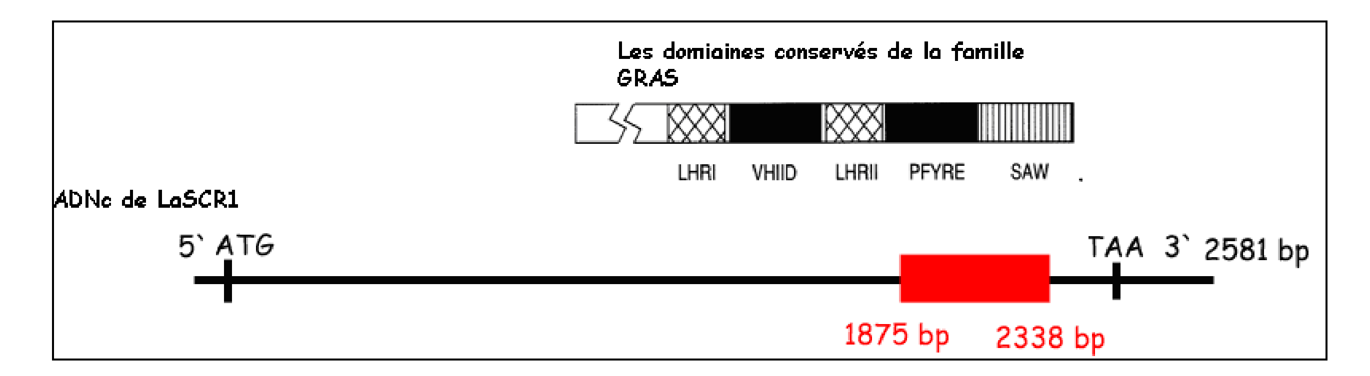


Figure III.19. Partie de l'ADNc de LaSCR1 utilisée dans la construction du vecteur d'ARNi

4-1-1 b Clonage du fragment LaSCR1 dans le vecteur Sphellsgate

Le fragment de 500 pb de l'ADNc de LaSCR1 a été amplifié par PCR dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant: 20 ng du plasmide (contenant l'ADNc de LaSCR1), tampon 10X pour la PCR additionné de $MgCl_2$ (Proméga), 0.2 mM de dNTP, 10 ng de chacune des deux amorces et 1.2 U/µl de Taq polymérase.

La réaction PCR a été optimisée selon le programme d'amplification suivant: 3 min à 94 ºC et 35 cycles de 1 min à 94 ºC, 1 min à 55 ºC et 1 min à 72 ºC et avec une étape d'élongation de 5 min à 72 ºC. Les produits de l`amplification sont vérifiés sur gel d'agarose à 1 %. Les amplifias sont ensuite soumis à une réaction de Vent polymérisation qui consiste à émousser les bouts des fragments amplifiés pour permettre leurs insertions dans le vecteur pENTR. Le fragment d'ADN inséré est ensuite transféré du pENTR au vecteur Sphellsgate par une réaction de recombinaison entre les sites attL1 et attL2 du pENTR et les sites attR1 et attR2 du Sphellsgate. L'ADN est inséré dans le Sphellsgate en orientations sens et antisens. L'insertion et l'orientation des fragments d'ADN dans le Sphellsgate sont vérifiées par des réactions de séquençage en utilisant les amorces HG1236 et HG1237. Le plasmide recombiné est ensuite électroporé dans l'*Agrobacterium rhizogenese* A4T pour la transformation du lupin et dans Arqual pour la transformation de *Medicago*.

4-2 Silençage du gène LaSCR chez *L. albus*

4-2-1 Résultats

Le lupin blanc a été transformé par l'*A. rhisogenese* contenant le vecteur d'ARNi préparé en utilisant les deux méthodes de transformation du lupin préalablement détaillées. La

transformation du lupin par injection des hypocotyles a été répétée sept fois et la transformation par trempage racinaire a été répétée 3 fois. En parallèles, des tests témoins ont été réalisés. En effet, les plantes de lupin témoins ont été transformées par *A. rhizogenese* contenant le vecteur Sphellsgate avec une partie du gène Myo comme insert.

4-2-1 a. Analyse morphologique des racines transgéniques des mutants LaSCRi

La transformation du lupin par *A. rhizogenese* a permis de générer des plantes composites avec un système racinaire transgénique et une partie aérienne non transgénique. Ainsi, 5 à 7 semaines après la transformation du lupin les racines transgéniques ou racines chevelues (racines émergeant du site d'injection ou du point de coupure) sont collectées. La transformation du lupin par *A. rhizogenese* hébergeant le vecteur LaSCR::ARNi en utilisant la technique de trempage racinaire se traduit par un phénotype visible différent de celui des plantes témoins (Figure III.20). Les plantes silençées LaSCRi montrent une diminution au niveau de la masse totale des racines chevelues en comparaison avec les plantes témoins (Myoi). Pour chaque plante SCRi et Myoi, le nombre, la masse et la longueur des racines chevelues ont été mesurés. La comparaison des plantes SCRi et témoins a été réalisée par le calcul de la moyenne de chacune des trois mesures. La figure III.21 résume la combinaison de l'ensemble des expériences de transformation réalisées. On remarque une diminution significative du nombre, de la longueur et de la masse des racines chevelues au niveau des plantes LaSCRi en comparaison avec les plantes témoins.

4.-2-1 b. Mesure de l`expression du LaSCR au niveau des racines transgéniques

Afin de vérifier si la transformation du lupin par LaSCRi a engendré la réduction de l'expression du gène SCR une RT-PCR a été réalisée à partir des racines transgéniques (Figure III.22). Pour ceci, les ARN ont été isolés à partir de chaque racine transgénique ARNi et ont été reversement transcrits. Une amplification a été réalisée moyennant des amorces spécifiques au dsRED (une partie du vecteur Sphellsgate) pour vérifier la réussite de transformation génétique. Le gène Actine est utilisé comme gène de ménage ou transcrit invariant pour équilibrer la quantité d'ARN entre les échantillons. L'expression du SCR a été vérifiée par une RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène LaSCR1 et LaSCR2. Les amorces utilisées *LaSCR1-F*, 5`-CAA CAC TAG TGT CCC ACA GTA G-3` et *LaSCR1-R*, 5`-GCTGAGAATCTGGAAGATGC-3` ont permis d'amplifier un fragment de 500pb du gène

LaSCR1 et les amorces *LaSCR2-F*, 5`- CTCACTCACCTTGGCTTCTCT -3` et *LaSCR2-R*, 5`-CTCAACAGTAGCACCGGTACTAG-3` ont permis d'amplifier un fragment de 650 pb du gène LaSCR2. Ces amorces permettent d'amplifier des fragments différents du fragment du gène utilisé dans la construction du vecteur recombinant d'ARNi.

La figure III.22 montre la sous expression du gène LaSCR1 au niveau de 7 échantillons (racines chevelues) SCRi obtenus après la transformation par la méthode d'injection en comparaison avec 8 échantillons témoins. Ainsi, la transformation du lupin par le vecteur LaSCR::ARNi a permis de réduire l'expression du gène LaSCRi au niveau racinaire. Le degré d'expression de SCR au niveau des plantes SCRi a été corrélé avec le degré du phénotype obtenu (réduction du nombre, taille et masse du système racinaire).

De la même manière La figure III.23 montre la sous expression des deux gènes SCR, LaSCR1 et LaSCR2 au niveau des échantillons (racines chevelues) SCRi obtenu après la transformation par la méthode de trempage racinaire. Au niveau des échantillons SCRi on note différents degrés d'expression des deux gènes SCR. On remarque que l'expression des deux gènes LaSCR1 et LaSCR2 au niveau des échantillons SCRi3, SCRi4 et SCRi5 est nulle et correspond à un silençage total de SCR. Par contre l'expression des deux gènes SCR au niveau des échantillons SCRi1 et SCRi2 est moyenne en comparaison avec celle au niveau des plantes témoins. Par ailleurs la sous expression de LaSCR1 et de LaSCR2 au niveau des échantillons SCRi1-SCRi5 traduit le silençage du SCR au niveau de ces échantillons. Le fragment de LaSCR1 utilisé dans l'ARNi a permis de silençer les deux gènes LaSCR1 et LaSCR2.

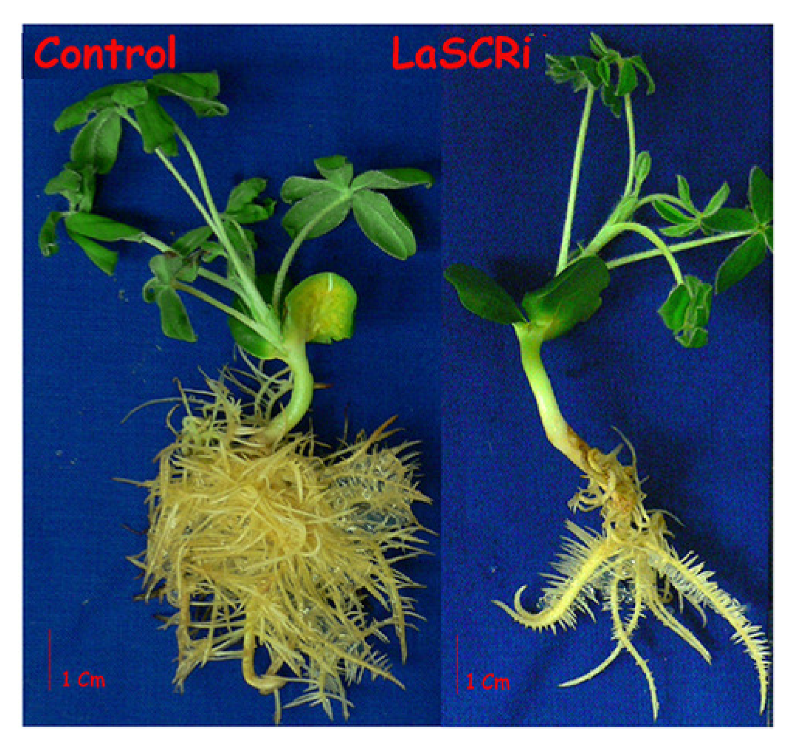


Figure III.20. Phénotype des plantes LaSCR::ARNi et Myo::ARNi (témoin) du lupin obtenues par la méthode de transformation par immersion racinaire.

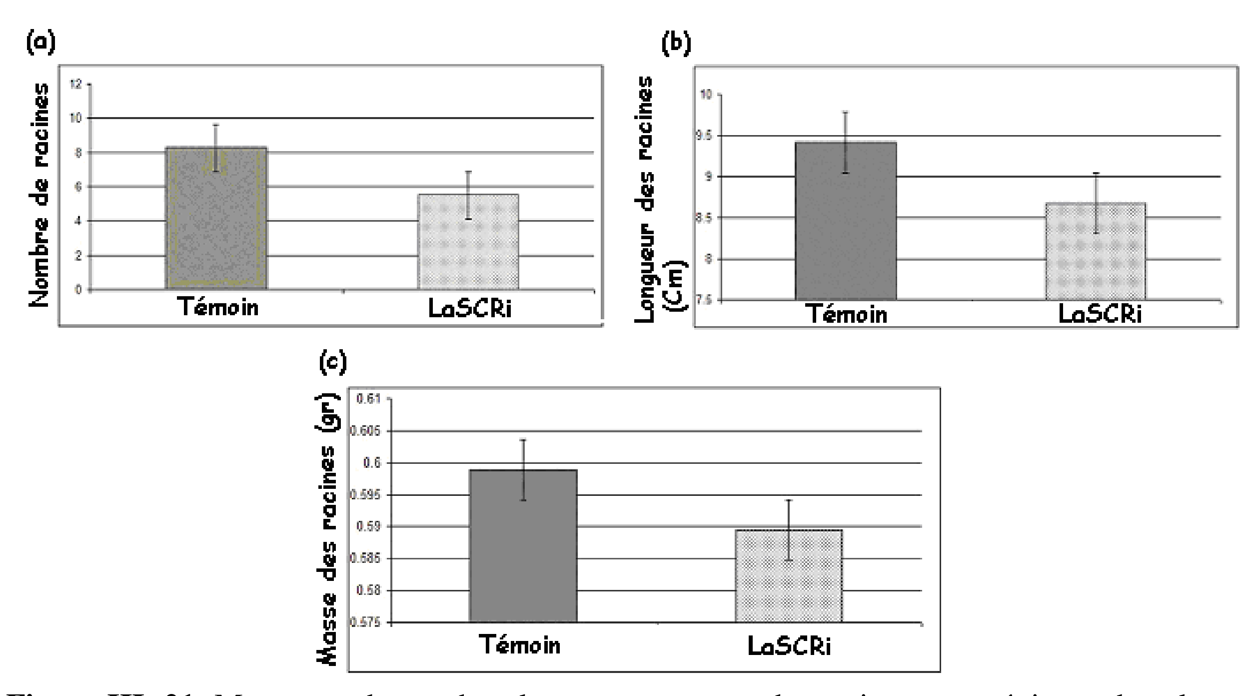


Figure III. 21. Moyennes du nombre, longueur et masse des racines transgéniques des plantes ARNi du lupin en comparaison avec les plantes Myo témoins.
La barre d'erreur indique la déviation standard.

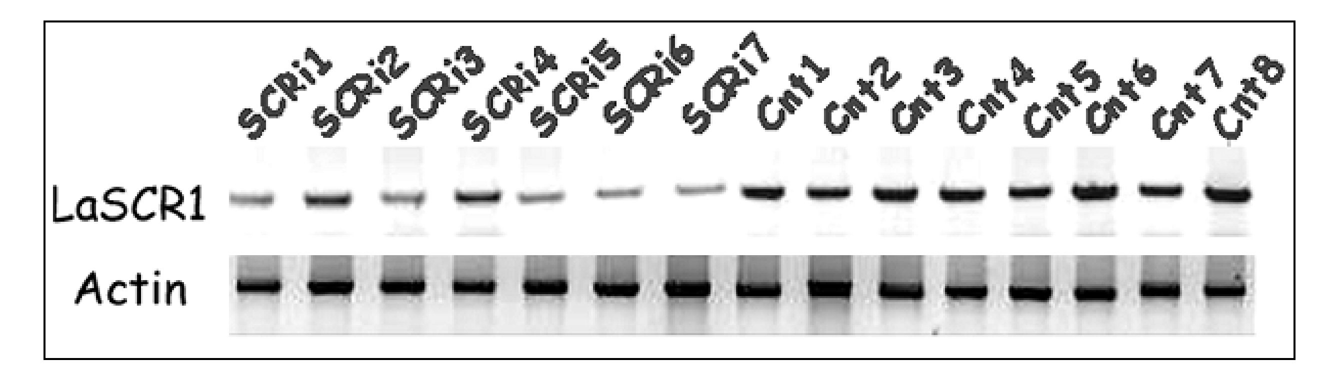


Figure III. 22. Une RT-PCR des ARN isolés de plantes SCRi et Myoi transformées par la méthode de trempage racinaire.
L`actine a été utilisée comme marqueur interne pour équilibrer la quantité d'ARN utilisé.

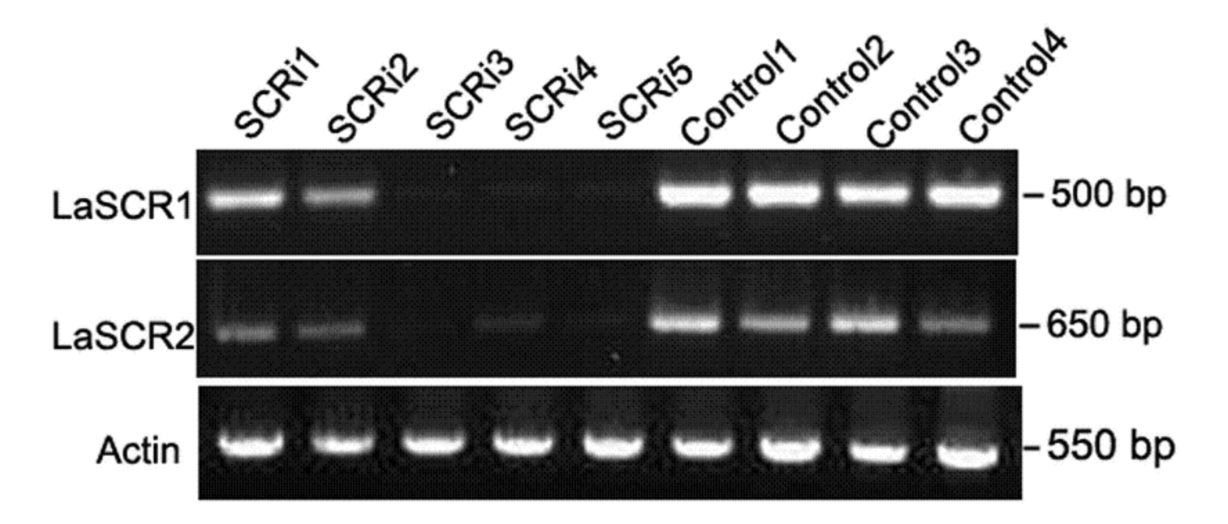


Figure III. 23. RT-PCR des ARN isolés de plantes de lupin SCRi et Myoi transformées par la méthode d'injection.
L`actine a été utilisée comme marqueur interne pour équilibrer la quantité d'ARN utilisé.

4-3 Silençage du gène MtSCR chez *Medicago truncatula*

4-3-1 Résultats

4-3-1 a Analyse morphologique des racines transgéniques des mutants LaSCRi

La transformation de *Medicago truncatula* par *A. rhizogenese* avec le vecteur d'ARNi contenant un fragment du gène SCR du lupin a permis de générer des plantes composites. En effet, seul le système racinaire ou racines chevelues est transgénique. La comparaison entre les plantes transgéniques LaSCRi et les plantes témoins Myoi montre une nette différence au niveau de leurs phénotypes (Figure III.24). Les plantes LaSCRi présentent une réduction claire au niveau de la taille du système racinaire en comparaison avec les plantes témoins.

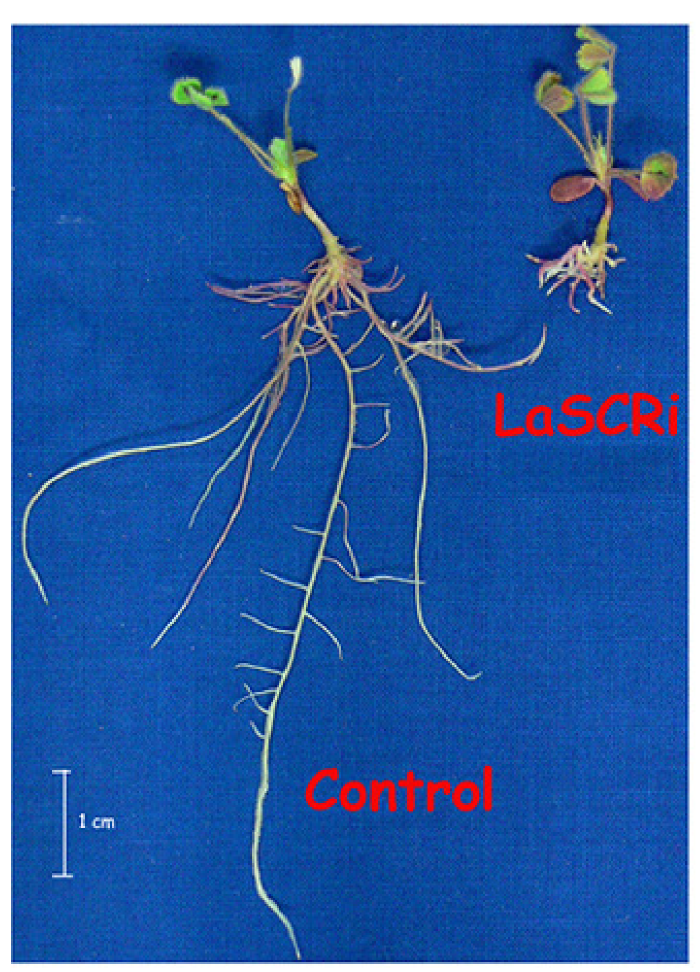


Figure III.24. Phénotype des plantes *Medicago truncatula* transformées par *A. rhizogenese* avec le vecteur d'ARNi contenant un fragment du gène SCR du lupin.

4-3-1 b. Mesure de l`expression du MtSCR au niveau des racines transgéniques

Une RT-PCR a été réalisée afin de vérifier l'expression du gène SCR de *Medicago* MtSCR au niveau des échantillons d'ARNi (Figure III.25). Ces échantillons ont été obtenus après transformation de *Medicago* par le vecteur d'ARNi contenant une partie du gène SCR du lupin. La RT-PCR a été optimisée en utilisant les deux amorces spécifiques du gène SCR de *Medicago* MtSCR, LS08 5' CGTAACGTACTTGCAGTTGG 3' et LS09 5' ACCGTCCGATCTTCATCAAC 3'. A partir de la figure III.25 on note que le gène MtSCR présente différents degrés d'expression au niveau des échantillons SCRi. Le degré d'expression de MtSCR a été corrélé au degré de phénotype obtenu. Ainsi, l'expression de MtSCR a été très faible au niveau des échantillons SCRi1, SCRi2 et SCRi3 présentant des systèmes racinaires très réduits. Aussi, l'expression de MtSCR a été moyenne au niveau des échantillons SCRi4 et SCRi5 avec des systèmes racinaires de taille moyenne. Par contre, au niveau des échantillons SCRi6, SCRi7 et SCRi8 avec un système racinaire de taille similaire à celle des plantes témoins on remarque que l'expression de MtSCR est comparable à celle du témoin. Cette corrélation entre le silençage du gène MtSCR et le degré du phénotype obtenu montre l'implication de SCR dans le développement racinaire normal chez *Medicago truncatula*.

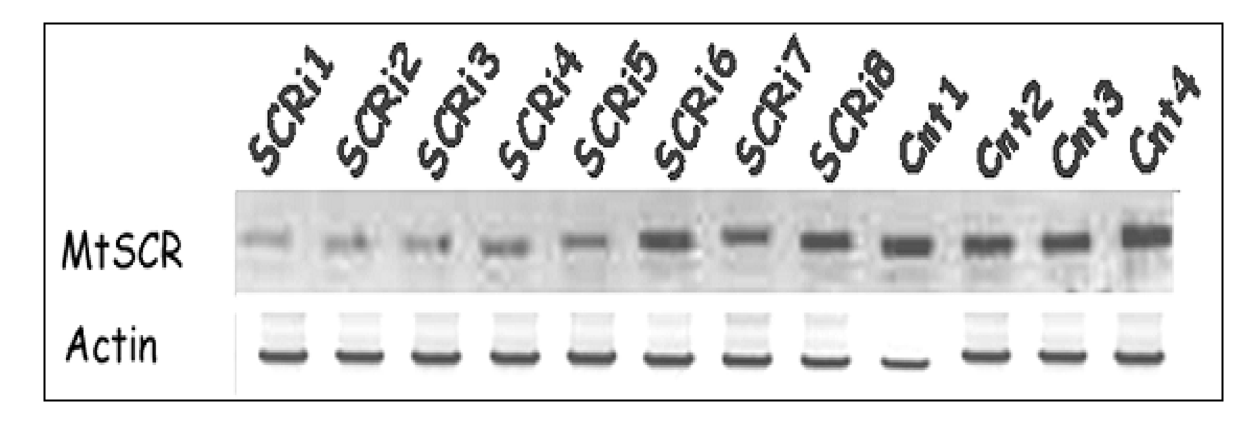
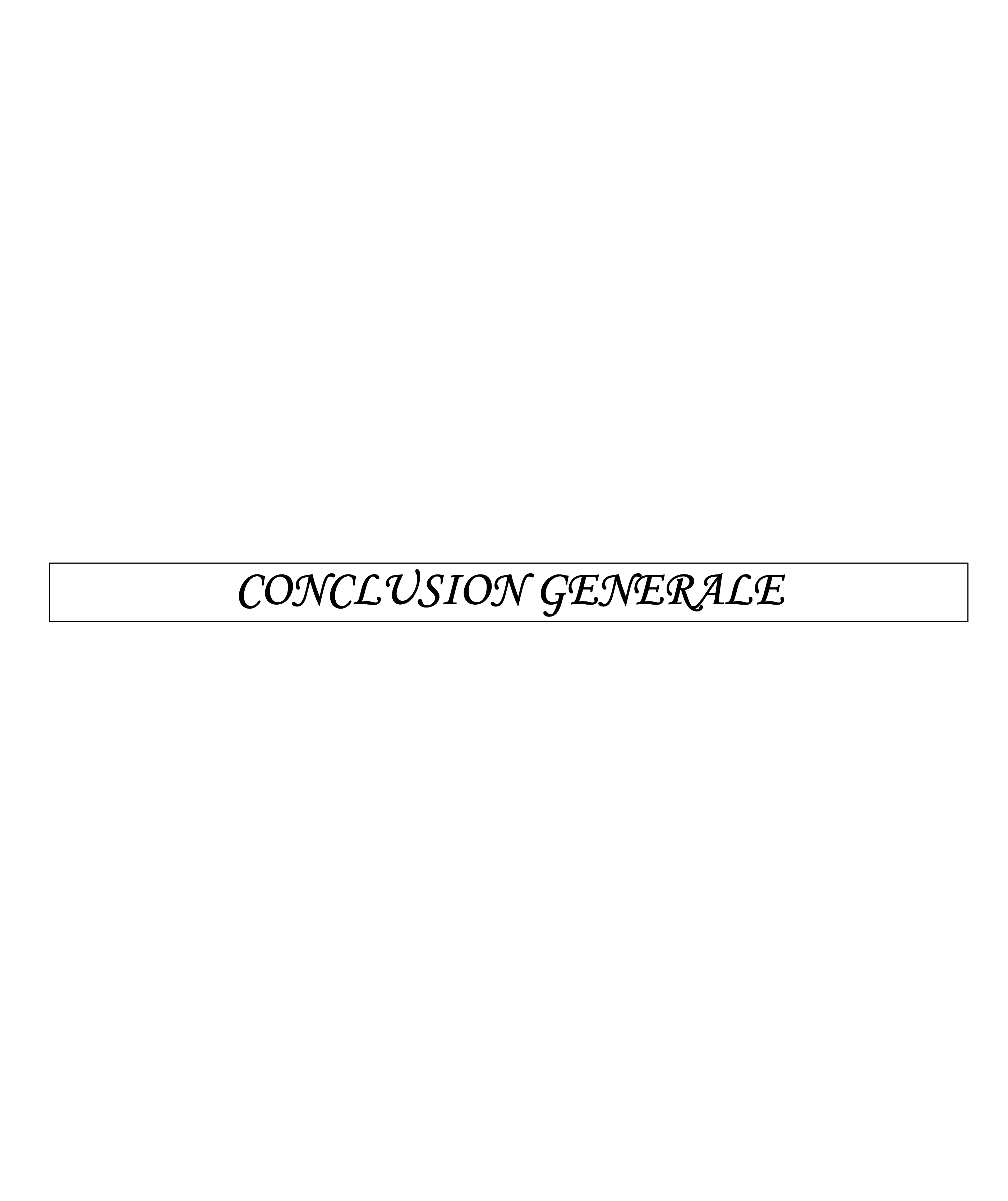


Figure III. 25. RT-PCR des ARN des plantes LaSCRi de *Medicago truncatula* (SCRi1-SCRi8) et des plantes témoins (Cnt1-Cnt4).
Le gène actine est utilisé comme transcrit invariant pour équilibrer la quantité d'ARN.

4-4 Conclusion

La transformation de *Lupinus albus* et de *Medicago truncatula* avec le vecteur LaSCR::ARNi a permis de générer des plantes composites avec un phénotype visible. Les plantes SCRi montrent un système racinaire plus réduit que celui des plantes témoins. Ce phénotype a été accompagné par une réduction de l'expression des gènes SCR LaSCR1, LaSCR2 et MtSCR. L'efficacité de LaSCR::ARNi dans la diminution du transcrit de SCR chez le lupin et la luzerne et la réduction du système racinaire montrent la conservation de la fonction de SCR et son rôle dans le développement racinaire chez les légumineuses.

Le phénotype visuel observé chez *Lupinus albus* et *Medicago truncatula* ARNi a été similaire à celui obtenu au niveau des mutants T-DNA *scr-1* et *scr-2* d'*Arabidopsis thaliana* (Di Laurenzio *et al*. 1996) et aussi au niveau des plantes ARNi d'*Arabidopsis SCRi-1 et SCRi-2* (Cui *et al*. 2007).



CONCLUSION GENERALE

Les légumineuses présentent une grande importance en tant que cultures vivrières dans le monde entier. Sur le plan agronomique, les légumineuses constituent une source majeure d'azote grâce à leur relation symbiotique avec les rhizobiums. Cette symbiose permet la transformation de l'azote atmosphérique en formes assimilables par les organismes.

Sur le plan économique, les légumineuses couvrent le 1/3 des besoins alimentaires humains en Azote et 25% des productions mondiales majeures en cultures. Aussi, sur le plan nutritionnel, les légumineuses sont cultivées essentiellement pour leurs graines dotées d'une grande valeur nutritionnelle et destinées à l'alimentation humaine et animale.

De part cette importance, la recherche sur les légumineuses tend vers la génération de cultures avec un meilleur rendement et des caractères de résistances aux stress biotique et abiotique (Liu et al, 2000; Chen et al. 2002; Fiehn 2002; Gesch et al. 2002; Graves and Haystead 2002; Castle et al. 2004; Chen and Gallie 2004; Glombitza et al. 2004; Hao et al. 2004; Lu and Chen 2004; Liu and Li 2005; Grennan 2006).

Ceci, nécessite l'évaluation du germplasme, une bonne compréhension de la biologie des plantes et des interactions plantes- environnement. Afin de répondre à ces objectifs plusieurs technologies et ressources sont disponibles: les marqueurs moléculaires, les puces à ADN, les ESTs, la transformation, l'ARNi…..etc

La caractérisation des germplasmes prend avantage des techniques de biologie moléculaire. Ces techniques ont connu une grande extension depuis les années 80 et surtout avec le développement des techniques de PCR. L'utilisation des marqueurs moléculaires est en perpétuelle croissance tant en génomique structurale qu'en génomique fonctionnelle. L'évaluation de la diversité des ressources phytogénétiques constitue une étape clé dans les programmes d'amélioration et de conservation de ces ressources dans le but d'une utilisation durable.

D'un autre côté, le progrès des études sur la biologie des légumineuses est lié au développement de deux plantes modèles *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula*. Ces deux organismes diploïdes présentent des génomes de taille modeste et sont favorables à la transformation génétique. Le nombre d'articles consacrés à ces deux systèmes reflète leur succès. Ces progrès sont aussi facilités par l'accès à l'information à travers les plateformes bioinformatiques et les différents sites web. Exemple du manuel de *M. truncatula* (http://www.noble.org/MedicagoHandbook/) qui propose gratuitement des protocoles et plusieurs informations utiles. La synténie entre le génome

de *M. truncatula* et de *L. japonicus* avec les autres légumineuses indique que ces plantes modèles vont contribuer dans la compréhension de la biologie des plantes de culture (O'Brian et Vance, 2007). Les recherches sur d'autres plantes modèles comme *Arabidopsis thaliana* et *Glycine max* ont permis de répondre à plusieurs questions sur les mécanismes de développement des plantes.

Vu l'importance accordée à bien comprendre la biologie des plantes, plusieurs projets de recherche se sont focalisés sur les éléments essentiels pour le développement et la croissance des plantes. On cite le phosphate, comme étant le second élément limitant de la croissance des plantes après l'azote. Le phosphate est utilisé par les plantes sous la forme de Pi qui est immobile et inégalement réparti dans le sol. On reconnait plus de 30% des terres arables du monde qui nécessitent l'apport d'engrais phosphatés pour les cultures (Vance, 2003). Ces engrais constituent des ressources non renouvelables qui sont entrain de devenir moins disponibles et plus coûteuses. Quelques scientifiques estiment que les réserves naturelles en Phosphate seront facilement épuisées d'ici 2060 (Steen, 1997; Vance, 2001; Vance, 2003). Paradoxalement, une partie du phosphate appliqué pour les systèmes de cultures intensives contribue à la pollution des eaux souterraines et de l'environnement marin.

Ainsi, la maîtrise de l'amélioration de l'acquisition et de l'utilisation du phosphate par les plantes est critique pour une production de cultures saines respectant l'environnement.

Dans la première partie de nos travaux de recherche, nous avons approché les relations inter- et intra- spécifiques de quatre espèces de lupin marocains (*L. albus*, *L. cosentinii*, *L. luteus* et *L. angustifolius*). Les marqueurs ISSR et AFLP ont permis de révéler un haut niveau de polymorphisme à l'échelle inter- spécifique. Malgré la similarité élevée observée entre les quatre espèces, chaque espèce a été caractérisée par des marqueurs uniques.

A l'échelle intra- spécifique les marqueurs ISSR ont permis de détecter un haut niveau de polymorphisme chez *L. albus*, *L. luteus* et *L. cosentinii*. Des niveaux de similarités variables ont été révélés entre les différentes populations. Néanmoins, la plus grande similarité a été obtenue entre les populations des espèces cultivées *L. albus* et *L. luteus*. Le système de reproduction autogame et allogame du lupin suppose un flux de gènes entre les populations de la même espèce. Ainsi, l'autogamie et l'allogamie peut expliquer la similarité entre les accessions éloignées géographiquement. Chaque population a été caractérisée par des marqueurs spécifiques. De ce fait, ces populations peuvent être considérées comme des entités conservées.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons essayé de contribuer à la compréhension du développement des racines proteoïdes du lupin blanc.

Deux gènes SCR du lupin appelés consécutivement LaSCR1 et LaSCR2 ont été isolés et caractérisés. Ces deux gènes se sont exprimés dés les stades précoces du développement des racines proteoïdes. L'expression des LaSCRs a été liée avec le développement des racines proteoïdes. Cette expression s'est révélée indépendante du niveau en phosphore chez les plantes. Les gènes SCR du lupin se sont exprimés de façon permanente au niveau de l'endoderme et du centre quiescent. La localisation de l'expression a été abordée par une hybridation *in situ* et par l'expression du promoteur:: gène rapporteur GUS. Enfin, nous avons montré que le silençage de l'expression du SCR au niveau des racines du *Lupinus albus* et de *Medicago truncatula* entraine une réduction remarquable du développement racinaire chez ces deux plantes.

Plusieurs perspectives de recherches peuvent se dégager des résultats obtenus dans ce travail de thèse:

- Préciser la structuration de la diversité des lupins marocains en analysant une collection plus large avec plus d'accessions et en incluant l`espèce endémique *L. atlanticus*.
- Utiliser des marqueurs codominants comme les SSR et les SNP.
- Exploiter les marqueurs uniques identifiés pour des approches de recherche de QTL à des fins d'amélioration génétique et agronomique.
- Confirmer les résultats du profilage avec des tests similaires et des expériences d'expression (Northern blots, RT-PCR et qPCR).
- Confirmer les régions cis-régulatrices identifiées aux niveaux des promoteurs avec des analyses par délétions.
- Confirmer la fonction du SCR par des tests de surexpression du gène.
- Etudier la structure et l'expression du SCR chez les autres espèces de lupin

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, *et al*. (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252 (5013): 1651–6.

Ainouche A.K. and Bayer R. j. (1999) Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae: papilionoideae) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. American Journal of Botany 86(4): 590–607.

Ainouche A.K., Bayer R.J. (2000). Genetic evidence supports the new anatolian lupine accession, Lupinus anatolicus, as an Old World ''roughseeded'' lupine (Section Scabrispermae) related to L. pilosus. Fol. Geobot. 35: 83–95.

Ainouche A. K., Bayer R. J., Cubas P.,MissetM. T. (2003). Phylogenetic relationships within tribe Genisteae (Papilionoideae) with special reference to genus Ulex. In: Klitgaard B. B., Bruneau A. (eds.) Advances in Legume systematics part 10, Higher Level Systematics. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 239–252.

Ainouche A., Bayer R. J., and Misset M.-T. (2004). Molecular phylogeny, diversification and character evolution in *Lupinus* (Fabaceae) with special attention to Mediterranean and African lupines. Plant Syst. Evol. 246: 211–222.

Anderson JA, Churchill GA, Sutrique JE, Tanksley SD and Sorrells ME (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36:181-186.

Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408.

Becker, J., P. Vos, M. Kuiper, F. Salamini, and M. Heun. (1995). Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Mol. Gen. Genet. 249:65–73.

Benfey Philip N., Linstead Paul J., Roberts Keith, Schiefelbein John W., Hauser Marie-Theres and Aeschbacher Roger A..(1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. Development 119, 57-70.

Benfey Phylip N. 2006. Unraveling the Dynamic Transcriptome. The plant cell. Vol. 18, 2101–2111.

Benzecri J.P. (1973).**L'analyse des données**. Tome 2: **L'analyse des correspondances**. Dunod.

Bernatsky, R., and Tanksley, S., 1986. Toward a saturated linkage map in *tomato* based on isozymes and random C-DNA sequences. Genetics 112:887-898.

Boisson-Dernier A. Andriankaja A., Chabaud M., Niebel A., Journet E.-P., Barker D. and de Carvalho-Neibel F. (2005) *MtENOD11* gene activation during rhizobial infection and

mycorrhizal arbuscule development requires a common AT-rich-containing regulatory sequence. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 18: 1269-76.

Bolle C (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. Planta 218:683–692.

Bostein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 32: 314–331.

Budak H, Pedraza F, Baenziger PS, Cregan PB, Dweikat I (2003). Development and utilization of SSR to estimate genetic diversity in a collection of pearl millet germplasm. Crop Sci. 43:2284–2290

Castle LA, Siehl DL, Gorton R (2004) Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. Science 304(5674):1151-1154.

Chalmers, K. J., R. Waugh, J. I. Sprent, A. J. Simons, and W. Powell. (1992). Detection of genetic variation between and within populations of Gliricidia sepium and G, maculata using RAPD markers, Heredity 69, 465.

Chao S., Sharp P.J., Worland A.J., Warham E.J., Koebner R.M.D., Gale M.D. *(1989).* RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet. 78:495–504.*

Chen XM, Liu J, Cheng YL (2002) HEN1 functions pleiotropically in Arabidopsis development and acts in C function in the flower. Development 129:1085.

Chen Z and Gallie DR (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. Plant Cell 16:1143-1162.

Christoffels A, van Gelder A, Greyling G, Miller R, Hide T, Hide W. (2001). STACK: Sequence Tag Alignment and Consensus Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 29 (1): 234–8.

Christopher A. Cullis. (2004). Plant genomics and proteomics.

Clements, J. C., B. J. Buirchell, and W. A. Cowling. (1996). Relationship between morphological variation and geographical origin or selection history in *Lupinus pilosus. Plant Breeding* 115: 16–22.

Collier R., Fuchs B., Walter N., Kevin L.W. and Taylor C.G. (2005). *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J.* 43: 449-457.

Consortium- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018.

Cowling, W.A. (1986). Collection of Wild Lupins in Greece. Plant Gen. Resour. Newslet. IBPGR/FAO, 1986. V.65. P.20-22.

Cowling W.A., Buirchell B.J. and Tapia M.E. (1998). Lupin. *Lupinus* L. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. 23. IPGRI, Rome, Italy.

Crane C., Wright E., Dixon R.A. and Wang Z.-Y. (2006). Trangenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223: 1344-1354.

Cristofolini, G. (1989). A serological contribution to the systematics of the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Plant Systematic and Evolution* 166: 265–278.

Cui H., Levesque M. P., Vernoux T. , Jung J. W., Paquette A. J., Gallagher K. L., Wang J. Y., Blilou I., Scheres B., Benfey P. N. (2007). An Evolutionarily Conserved Mechanism Delimiting SHR Movement Defines a Single Layer of Endodermis in Plants. *SCIENCE*. VOL 316 20.

Deng, X.-W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A. & Quail, P.H. (1992) COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a Gb homologous domain. Cell 71, 791±801.

Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, *et al* .(August 2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote Ostreococcus tauri unveils many unique features. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (31): 11647–52.

Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Feldmann, K. A., and Benfey, P. N. (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root, Cell 86, 423-33.

Dinkelaker B, Hengeler C, Marschner H. (1995). Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. Bot Acta 108: 183–200.

Dinkelaker B, Romheld V, Marschner H. (1989). Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). Plant Cell Environ 12: 285–292.

Dunn D. B. et Gillett J. (1966) Lupines of Canada and Alaska. Queen’s Press Ottawa Canada.

Dunn, D. B. (1971). A case of long range dispersal and ‘‘rapid’’ speciation in *Lupinus*. *Transactions of the Missouri Academy of Science* 5: 26–38.

Dunn, D. B. (1984). Cytotaxonomy and distribution of the New World lupin species. Proceedings of the Third International Lupin Conference, June 4–8, 67–85. La Rochelle, France.

Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P. and Kiss, G.B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417:962-966.

Fiehn O (2002) Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes.Plant Mol Biol 48:155-171.

Field D., and Wills C. (1996). Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. Proc. R. Soc. Lond. 263 :209-215.

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature* **391** (6669): 806–11.

Fleischmann RD., Adams MD., White O., Clayton RA., Kirkness EF., Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, and al. (1995). "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd.". *Science* 269: 496–512.

Fourmann M, Barret P, Froger N, Baron C, Charlot F, Delourme R, Brunel D. (2002) From Arabidopsis thaliana to Brassica napus: development of amplified consensus genetic markers (ACGM) for construction of a gene map. Theor Appl Genet 105:1196–1206.

Gardner WK, Parberry DG, Barber DA. (1982) The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interface. Plant Soil 68: 19–32.

Gesch RW, Kang IH, Gallo-Meagher M (2002) Rubisco expression in rice leaves is related to genotypic variation of photosynthesis under elevated growth CO2 and temperature.
Plant Cell Environm 26(12):98-107.

Giancola S., McKhann H., Berard A., Camilleri C., Durand S., Libeau P., Roux F., Reboud X., Gut I.G, Brunel D. (2006). Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. Theor Appl Genet 112:1115–1124.

Gilbert G.A., Knight J.D., Vance C.P. & Allan D. (2000) Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. *Annals of Botany* 85, 921-928.

Gill, B. S., K. S. Gill, W. J. Raupp, J. Delaney, R. S. Kota, L. Mickelson, D. Hassawi, A. K. Fritz, T. S. Cox, S. H. Hulbert, R. G. Sears, T. R. Endo, D. Namuth and N. L. V. Lapitan. (1993). Genetic and physical mapping in Triticum tauschii and Triticum aestivum. In: D. Hoisington and A. NcNab (eds), Progress in Genome Mapping of Wheat and Related Species Proceedings of the 2rd Public Workshop Intern. Triticeae Mapping Initiative, 22-26 Sept. 1992, 10-17, CIM-MYT, Mexico DF.

Gladstones, J. S. (1970). Lupins as crop plants. Field Crop Abstr. 23: 123-148.

Gladstones, J. S. (1974). Lupins of the Mediterranean region and Africa. *Western Australian Department of Agriculture, technical bulletin* 26: 1–48.

Gladstones J.S. (1994) An historical review of lupins in Australia. 1-38. In: DracupMand Palta J (eds) Proceedings of the First Australian Lupin Technical Symposium. Department of Agriculture, Western Australia, pp 1-38.

Gladstones J.S. (1998). Distribution, origin, taxonomy, history and importance. In: Gladstones J.S., Atkins C. and Hamblin J. (eds), Lupins as Crop Plants: Biology, Production, and Utilization. CABI, Oxon, U.K., pp. 1–40.

Glombitza C, Dubuis PH, Thulke O (2004) Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. Plant Molec Biol 54:817-835.

Godwin, I.D., E.A.B. Aitken & L.W. Smith. (1997). Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18: 1524–1528.

Goff, S.A., Cone, K.C. & Chandler, V.L. (1992) Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. Genes Dev. 6, 864±875.

Goff SA, Ricke D, Lan TH, *et al* .(April 2002). "A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica)". *Science (journal)* 296 (5565): 92–100.

Goldstein AH. (1992) Phosphate starvation inducible enzymes and proteins in higher plants. *In* JL Wray, ed, Society for Experimental Biology Seminar Series 49: Inducible Plant Proteins. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 25–44.

Graham M.A., Ramirez M., Valdéz-López O., Lara M. Tesfaye M. & Vance C.P. (2006) Identification of candidate phosphorus stress induced genes in *Phaseolus vulgaris* L. through clustering analysis across several plant species. *Funct. Plant Biol.* 33, 789-797.

Graves PR and Haystead TAJ (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. Microbiol Molec Biol Rev 66(1):39-63.

Gregory M, Pascal G, Christian JA. (2004) Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. Plant Physiol 136:3478- 3485.

Grennan AK (2006) Abiotic stress in rice. An "omic" approach. Plant Physiol 140:1139-1141.

Gupta PK, Varshney RK. (2000) The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113:163–185.

Hackbarth, J. and H. J. Troll. (1956). Lupins as grain Legumes and fodder plants: Pp. 1-51 in Handbook pf Plant Breeding, Part IV [in German] (H. Kappert and W. Rudof, eds.). 2nd edn. Verlag Paul Parey, Berlin and Hamburg.

Haig, S. M. (1998). Molecular contributions to conservation. Ecology, 79(2): 413-425.

Hammond Scott M., Caudy Amy A. and Hannon Gregory J. (2001). POST-TRANSCRIPTIONAL GENE SILENCING BY DOUBLESTRANDED RNA. Nature. Vol2. 110-119.

Hammond J.P., Broadley M.R. & White P.J. (2004) Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals of Botany* 94, 323–332.

Hancock, J. M. (**1996**). Simple sequences and the expanding genome. BioEssays **18**:421–425.

Hao GP, Wu ZY, Chen MS (2004) ATHK1 gene regulates signal transduction of osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. J Plant Physiol Mol Biol 30(5):553-560.

Heidstra R., Welch D. & Scheres B. (2004) Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Development* 18, 1964-1969.

Helentjaris, M Slocum, S Wright, A Schaefer and J Nienhuis. (1986). Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms Theor Appl Genet 72. 761-769.

Helliwell C.A., Wesley S.V., Wielopolska A.J. & Waterhouse P.M. (2002) High throughput vectors for efficient gene silencing in plants. *Functional Plant Biology* 29, 1217-1225.

Heyn CC et Herrnstadt I. (1977). Seed coat structure of Old World Lupinus species. Bot. Noti. ser 130. 427-35.

Hondelmann W. (1984):The lupin ancient and modern crop plant. Theor. Appl. Genet. 68, 1-9.

Huang, J. & S.M. Sun. (2000). Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theor Appl Genet 100: 1050–1060.

Hurst, H.C. (1994). Transcription factors. I. bZIP proteins. Protein Prof. *1*, 123–168.

Jaillon O, Aury JM, Noel B, *et al*. (September 2007). "The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla". *Nature* 449 (7161): 463–7.

Jefferson R.A. (1989). The GUS reporter gene system. *Nature* 342, 837-838.

Jeschke WD, Pate JS. (1995) Mineral nutrition and transport in xylem and phloem of *Banksia prionotes* (Proteaceae), a tree with dimorphic root morphology. J Exp Bot 46: 895–905.

Johnson J.F.,Vance C.P. & Allan D.L. (1996) Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenol pyruvate carboxylase. *Plant Physiology* 112, 31–41.

Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol 31*:957-973.

Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar & D.S. Brar, (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza.* Theor Appl Genet 100: 1311–1320.

Kamiya Noriko, Itoh Jun-Ichi, Morikami Atsushi, Nagato yasuo and Matsuoka Makoto. (2003). The SCARECROW gene's role in asymmetric cell division in rice plants. *The plant journal* 36, 45-54.

Kantety, R.V., X.P. Zeng, J.L. Bennetzen & B.E. Zehr. (1995). Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification.Molecular Breeding 1: 365–373.

Karl Pearson (1901). National Life from the Standpoint of Science, with a second edition in 1905. London: A. & C. Black.

Kashi Y., King D., Soller M. (1997). Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet. 13:74–78.*

Kass E., Wink M. (1997). Molecular phylogeny and phylogeography of Lupinus (Leguminisae) inferred from nucleotide sequences of the rbcL gene and ITS 1+2 regions of rDNA. Plant Syst. Evol. 208: 139–167.

Laajanen Kaisa, Irmeli Vuorinen, Vanamo Salo, Jarmo Juuti and Marjatta Raudaskoski. (2007). Cloning of *Pinus sylvestris SCARECROW* gene and its expression pattern in the pine root system, mycorrhiza and NPA-treated short roots. New phytologist. 175 : 230–243.

Lagudah, E.S., Appels, R., and McNeil, D. (1991). The *Nor-D3* locus of *Triticum tauschii*: Natural variation and genetic linkage to markers in chromosome 5. Genome, **34**: 387–394.

Lambers H., Shane M.W., Cramer M.D., Pearse S.J. & Veneklaas E.J. (2006) Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann Bot.* 67, 659-670.

Lamoril J., Ameziane N., Deybach J.-C., Bouizegarène P., Bogard M. (2008). Les techniques de séquencage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one. Immuno-analyse et biologie spécialisée (2008) 23, 260—279.

Lamont B.B. (2003) Structure, ecology and physiology of root clusters – a review. *Plant and Soil* 248, 1–19.

Lee Y, Tsai J, Sunkara S, *et al*. (2005). The TIGR Gene Indices: clustering and assembling EST and known genes and integration with eukaryotic genomes". *Nucleic Acids Res.* 33 (Database issue): D71–4.

Lee Mi-H., Kim B., Song S.-K, Heo J –O, Yu N., Lee S. A., Kim M., Kim D. G., Sohn S., Lim C. E., C. K. Suk, Lee M. M., Lim J. (2008) Large-scale analysis of the GRAS gene family in Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol. 67: 659-670.

Lefort-Buson, M., Rodolphe, F., et Charcosset, A. (1990a). De nouvelle perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs (Ière partie): A la recherche des locus importants. Biofutur, 91: 30-37.

Lefort-Buson, M., Rodolphe, F., et Charcosset, A. (1990b). De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs: La sélection assistée par marqueurs. Biofutur 91: 30-37.

Leonhardt, N., Kwak, J.M., Robert, N., Waner, D., Leonhardt, G., and Schroeder, J.I. (2004). Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a

recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. Plant Cell 16, 596–615.

Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhoub, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.P., Ané, J.M., Laubert, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C. and Debellé, F. (2004). A putative Ca^{2+} and calmodulin-dependant protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364.

Liu HS and Li FM (2005) Photosynthesis, root respiration, and grain yield of spring wheat in response to surface soil drying. Plant Growth Regul 45:149-154.

Liu J, Uhde-Stone C, Li A, Vance CP, Allan DL. (2001). A phosphate transporter with enhanced expression in proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). Plant Soil 237: 257–266.

Liu L, White MJ, MacRae TH. (1999) Transcription factors and their genes in higher plants: functional domains, evolution and regulation. Eur J Biochem 262: 247–257.

Liu Q, Zhang Y, Chen SY (2000) Plant protein kinase genes induced by drought ,high salt and cold stresses. Chinese Science Bulletin 45(13):1153-1157.

Lim Jun, Yrjo Helariutta, Chelsea D. Specht, Jee Jung, Lynne Sims, Wesley B. Bruce, Scott Diehn, and Philip N. Benfey. (2000). Molecular Analysis of the *SCARECROW* Gene in Maize Reveals a Common Basis for Radial Patterning in Diverse Meristems. *The Plant Cell*, Vol. 12, 1307–1318.

Lim J, Jung JW, Lim CE, Lee M-H, Kim BJ, Kim M, Bruce WB, Benfey PN. (2005). Conservation and diversification of *SCARECROW* in maize. *Plant Molecular Biology* 59: 619–630.

Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., Bisseling T. and Geurts R. (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 55: 983-92.

Lu MH and Chen JF (2004) Genetic engineering of plant for cold tolerance. Acta Bot Boreal-Occident Sin 24(10):1953-1958.

Ma, Z. Q., and N. L. V. Lapitan. (1998). A comparison of amplifed and restriction fragment length polymorphism in wheat. Cereal Res. Commun. 26, 7-13.

Mackill, D. J., Z. Zhang, E, D. Redona, and P. M. Colowit. (1996). Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome. 39, 969- 977.

Maheswaran, M., P. K. Subudhi, S. Nandi, J. C. Xu, A. Parco, D. C. Yang, and N. Huang. (1997). Polymorphism, distribution and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. Theor. Appl. Genet. 94, 39- 45.

Malamy, J. E., and Benfey, P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 33-44.

Malboobi MA and Lefebvre DD. (1995) Isolation of cDNA clones of genes with altered expression levels in phosphate-starved *Brassica nigra* suspension cells. Plant Mol Biol 28: 859–870.

Marschner H., Römheld V., Horst W.J. & Martin P. (1986) Root-induced changes in the rhizosphere- importance for mineral-nutrition of plants. *Z. Pflanzenernähr Bodenkd*. 149,441-456.

Matsuzaki M, Misumi O, Shin-I T, *et al.* (2004). Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga Cyanidioschyzon merolae 10D. *Nature* 428 (6983): 653–7.

Maughan, P. J., M. A. Saghai Maroof, G. R. Buss, and G. M. Huestis, (1996). Amplifed fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic analysis. Theor. Appl. Genet. 93, 392- 401.

Miller SS, Liu JQ, Allan DL, Menzhuber CJ, Fedorova M, Vance CP. (2001) Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. Plant Physiol 127: 594–606.

Mission J., Raghothama K.G., Jain A., Jouhet J., Block M.A., Bligny R. *et al.* (2005) A genome wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 102, 11934-11939.

Monteiro R, and P. E. Gibbs. (1986). A taxonomic revision of the unifoliolate species of *Lupinus* (Leguminosea) in Brazil. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 44: 71–104.

Gre´gory Montiel, Pascal Gantet1, Christian Jay-Allemand1, and Christian Breton. (2004). Transcription Factor Networks. Pathways to the Knowledge of Root Development. Plant Physiology, Vol. 136, pp. 3478–3485

Muller R., Morant M., Jarmer H., Nilsson L. & Nielsen T.H. (2007) Genome-wide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiology* 143, 156-171.

Naganowska Barbara, Wolko Bogdan, Sliwinska Elwira and Kaczmarek Zygmunt. (2003). Nuclear DNA content variation and species Relationships in the Genus *Lupinus* (Fabaceae).

Naganowska B., Wolko B., ´ liwin´ E. S Z. Kaczmarek ska,, and Schifino-Wittmann M.T. (2006). 2C DNA variation and relationships among New World species of the genus Lupinus (Fabaceae). Pl. Syst. Evol. 256: 147–157.

Nelson, J C., M. E. Sorrells, A. E. van Deynze, Y. H. Lu, M. Atinkson, M. Bernard, P. Leroy, J. D. Faris, and J. A. Anderson. (1995). Molecular mapping of wheat [Major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5, and 7. Genetics 141, 721-731.

Nesbitt, K. A., B. M. Potts, R. E. Vaillancourt, A. K. West, and J. B.Reid. (1995). Partioning and distribution of RAPDvariation in a forest tree species, Eucalyptus globulus (Myrtaceae). Heredity 74, 628-637.

Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Romheld V. (1999). Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. Planta 208: 373–382.

Neumann G, Massonneau A, Langlade N, Dinkelaker B, Hengeler C, Ro¨mheld V, Martinoia E. (2000). Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus L.*). Annals of Botany 85, 909–919.

Neumann, G. and Martinoia, E. (2002) Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments. Trends Plant Sci 7, 162–167.

Nybom, H. (1994). DNA fingerprinting -a useful tool in fruit breeding[Euphytica. 77, 59- 64.

O'Brian M. R. and Vance C. P. (2007). Legume Biology: Sequence to Seeds. Plant Physiology. Vol. 144, p. 537.

Ouenzar B, Hartmann C, Rode A and Benslimane A (1998) Date Palm DNA Mini-Preparation without Liquid Nitrogen. Plant Molecular Biology reporter 16: 263-269.

Parisi, M., Nuttall, R., Edwards, P., Minor, J., Naiman, D., Lu, J., Doctolero, M., Vainer, M., Chan, C., Malley, J., Eastman, S., and Oliver, B. (2004). A survey of ovary-, testis-, and soma-biased gene expression in Drosophila melanogaster adults. Genome Biol. 5, R40.

Penaloza, E., Gutierrez, A., Martinez, J., Munoz, G., Bravo, L.A. and Corcuera, L.J. (2002) Differential gene expression in proteoid root clusters of white lupin (*Lupinus albus*). Physiol. Plant. 116, 28–36.

Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. Genes Dev 11:3194–3205.

Phillips LL. (1957). *Chromosome numbers in Lupinus*. Madrono 14:30-36.

Planchuelo A. M. and Dunn D. B. (1984). The simple leaved lupines and their relatives in Argentina. Annals of the Missouri Botanical Garden. vol. 71, n°1, pp. 92-103.

Plitmann U. (1981). Evolutionary history of the Old World lupines. Taxon 30. (2): 430 – 437.

Plitmann U. et Pazy B. (1984). Cytogeographical distribution of the Old World *Lupinus*., vol. 38, pp. 531-539.

Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalsky. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2, 225- 238.

Purnell HM. (1960). Studies of the family Proteaceae. I. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species. Aust J Bot 8: 38–50.

Pysh LD, Wysocka-Diller J, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW- LIKE genes. Plant J 18:111–119.

Qi X. P. Stan and P. Lindhout. (1998). Use of locus-specific AFLP markers to construct a high density molecular map in barley. Theor. Appl. Genet. 96 376- 384.

Qiu J. van Santen E. and Tuzun S. (1995). Optimization of DNA amplification fingerprinting techniques to study genetic relationships of white lupin germplasm. Plant Breed. 114: 525–529.

Quandt H.J. Pühler A. and Broer I. (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6: 699-706.

Raghothama KG. (1999). Phosphate acquisition. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 665–693.

Ravel C, Praud S, Canaguier A, Dufour P, Giancola S, Balfourier F, Chalhoub B, Brunel D, Linossier L, Dardevet M, Beckert M, Rousset M, Murigneux A, Charmet G. (2004). DNA sequence polymorphism and their application in bread wheat. In: Vollmann J, Grausgruber H, Ruckenbauer P (eds) Genetic variation for plant breeding. Eucarpia: Tulln, Austria, pp 177–181.

Reiter, R. S., J. G. K. Williams, K. A. Feldmann, J. A. Rafalski, S. V. Tingey, and P. A. Scolnik. (1992). Global and local genome mapping in Arabidopsis thaliana by using recombinant inbred lines and random amplifed polymorphic DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1477-1481.

Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, *et al* .(2008). The Physcomitrella genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science (journal)* 319 (5859): 64–9.

Runge-Metzger A. (1995). Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global security. *In* H Tiessen, ed, Phosphorus in the Global Environment: Transfers, Cycles and Management. John Wiley & Sons, New York, pp 27–42.

Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes and Development* 17: 354–358.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA, Nature. 24;265(5596):687-95.

Sassa N, Matsushita Y, Nakamura T, Nyunoya H. (2001). The molecular characterization and *in situ* expression pattern of pea *SCARECROW* gene. *Plant and Cell Physiology* 42: 385–394.

Sato, N., Ohshima, K., Watanabe, A., Ohta, N., Nishiyama, Y., Joyard, J. & Douce, R. (1998) Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. Plant Cell 10, 859±872.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray. Science 270, 467–470.

Scheres B., Di Laurenzio L., Willemsen V., Hauser M.-T., Janmaat K., Weisbeek P. & Benfey P.N. (1995) Mutations affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific effects throughout the embryonic axis. *Development* 121, 53-62.

Schmid KJ, Sorensen TR, Stracke R, Torjek O, Altmann T, Mitchell-Olds T, Weisshaar B. (2003). Large-scale identification and analysis of genome-wide single- nucleotide polymorphisms for mapping in *Arabidopsis thaliana*. Genome Res 13:1250–125.

Shan, X., T. K. Blake, and L. E. Talbert,. (1999). Conversion of AFLP markers to sequence specific PCR markers in barley and wheat. Theor. Appl. Genet. 98, 1072- 1078.

Shane M.W. & Lambers H. (2005). Cluster roots: a curiosity in context. *Plant, Plant and Soil* 274, 101–125.

Shao HB, Chu LY, Zhao CX, Shao MA. (2006). Some advances in plant stress physiology and their implications in the Systems Biology Era. Colloids Surf B Biointerfaces 49(4).

Simpson, M. J. A. (1986). Geographical variation in *lupinus albus* L. II. Northwest Spain, the Nile Valley, the Balkans and Turkey. Plant Breed. 96: 241-251.

Smith, C. P. (1944). *Lupinus* L. *In* L. Abrahams [ed.], Illustrated Flora of the Pacific States 2, 483–519. Stanford University Press, Stanford, CA.

Stanton JA, Macgregor AB, Green DP. (2003). Identifying tissue-enriched gene expression in mouse tissues using the NIH UniGene database. *Appl Bioinformatics* 2 (3 Suppl): S65–73.

Stears, R.L., Martinsky, T., and Schena, M. (2003). Trends in microarray analysis. Nat. Med. 9, 140–145.

Steen I. (1997). Phosphorus availability in the 21st century. Management of a non-renewable resource. Phosphorus Potassium 217: 25-31.

Stein Lincoln D. et al, . 1998. The Genome Sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A Platform for Comparative Genomics. *PLoS Biology* 1: 166–192.

Stein LD et al.: (2001). WormBase: network access to the genome and biology of *Caenorhabditis elegans*. Nucleic Acids Research **29**: 82-86

Talhinhas P. , Neves-Martins J. Leitao J. (2003). AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. Plant Breeding Volume 122 Issue 6, Pages 507 – 510.

Tautz, D., Trick, M., and Dover, G. (1986). Crytic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. Nature 322: 652-656.

Tenaillon MI, Sawkins MC, Long AD, Gaut RL, Doebley JF, Gaut BS. (2001). Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (Zea mays ssp. mays L.). Proc Natl Acad Sci USA 98:9161–9166.

Turner, BL. (1957). The chromosomal distributional relationships of *Lupinus texensis* and *L. subcamosus*. *Madrono*, 14, 13.

Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, *et al.* (2006). The genome of black cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray)". *Science* 313 (5793): 1596–604.

Uhde-Stone, C., Zinn, K.E., Ramirez-Yanez, M., Li, A., Vance, C.P. and Allan, D.L. (2003) Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. Plant Physiol. 131, 1064–1079.

Uhde-Stone C., Liu J., Zinn K. E., Allan D. L. and Vance C. P. (2005). Transgenic proteoid roots of white lupin: a vehicle for characterizing and silencing root genes involved in adaptation to P stress. *The Plant Journal* 44, 840–853.

Van Zhong, G., and Burns, J.K. (2003). Profiling ethylene-regulated gene expression in Arabidopsis thaliana by microarray analysis. Plant Mol. Biol. 53, 117–131.

Vance C.P. (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology* 127, 390–397.

Vance C.P., Uhde-Stone C. & Allan D.L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 57: 423–447.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW.(1995). Serial analysis of gene expression. Science **270**: 484-487.

Venter J. Craig et al, (2001). The sequence of the human genome. Science. vol 291. no. 5507, pp. 1304 – 1351.

Vos PRH, Bleeker M, Rejians M, de Lee T, Hornes et M, Freijters A. (1995). AFLP: a new technique for DNA finger printing. Nucleic Acids Res 23: 4407–4414.

Watson JD et Crick FHC. (1953). Molecular structure of nucleic acids. Nature **171**: 737-738.

Watt M. & Evans J.R. (1999). Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology* 121: 317-323.

Weder J. K. P. (2002). Influence of experimental conditions on the reproducibility of RAPD-PCR identification of legumes and cereals. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 35 233–238.

Weisskopf L. Fromin N. Tomasi N. Aragno M. & Martinoia E. (2005). Secretion activity of white lupin's cluster roots influences bacterial abundance function and community structure. *Plant and Soil* 268 181–194.

Welsh J. and M. McClelland. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19 303.

Wolff K. E. Zietkiewicz & H. Hofstra. (1995). Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor Appl Genet 91: 439–447.

Williams J. G. K. A. R. K. Kubelik J. L. Livak J. A. Rafalski and S. V. Tingey. (1990). DNA polymorphisms amplifed by random primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18 6531-6535.

Withers PJA Edwards AC Foy RH. (2001). Phosphorus cycling in UK agriculture and implications for phosphorus loss from soil. Soil Use Manag 17: 139–149.

Wysocka-Diller J.W., Helariutta Y., Fukaki H., Malamy J.E. & Benfey P.N. (2000). Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127, 595-603.

Yang W. A.C. de Oliveira I. Godwin K. Schertz & J.L. Bennetzen. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. Crop Sci 36: 1669–1676.

Yu J Hu S Wang J *et al.* (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa L. ssp. indica*. *Science (journal)* 296 (5565): 79–92.

Zhu YL, Song QJ, Hyten DL, Van Tassell CP, Matukumalli LK, Grimm DR, Hyatt SM, Fickus EW, Young ND, Cregan PB. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in soybean. Genetics 163:1123–1134.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda, (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176–183.

Sites web utilisés

http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/.

http://www.bioinformatik.de/cgi-bin/browse/Catalog/Software/Online_Tools/

http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/

http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html

http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html

http://www.genome.ou.edu/SeqStrategy.html

http://www.genome.gov/10001812

http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix/

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/

http://www.tigr.org

http://us.expasy.org



ANNEXES

Annexe II.1- Electrophorèse des amplifias AFLP en conditions dénaturantes

1- Préparation des plaques de verre pour l'électrophorèse

Les petite plaque (sur laquelle va se fixer le gel) et la grande plaque doivent être bien nettoyées avec de l'éthanol et l'eau milliQ.

Traitement de la petite plaque par le binding silane (α-methacryloxypropyl trimetoxysilane):

- Etaler sur la plaque 1ml d'une solution de bind-silane [30µl de binding silane pure, 10 ml d'éthanol et 2.5 ml d'acide acétique glacial] avec du papier sopalin.
- Fixer le binding silane à 56C pendant 30 min.
- Enlever l'excès du dind-silane en essuyant la plaque avec de l'éthanol et de l'eau distillée 3 fois.
- Laisser sécher

Traitement de la grande plaque par le sigmacote (Diméthyl dichlorosilane):

- Etaler 1ml de sigmacote pur sur toute la plaque avec du sopalin
- Sécher la plaque à 56C pendant 30 min
- Enlever l'excès du sigmacote en essuyant la plaque avec de l'eau distillée une fois
- Laisser sécher
-

2- Préparation de la solution d'acrylamide (6%)

- Mélanger 22.5ml d'acrylamide 20%, 7.5 ml de TBE 1X, 31.5g d'urée et q.s.p 75 ml d'eau pure stérile.
- Avant de couler le gel, ajouter 37µl de TEMED et 1875 µl de persulfate d'ammonium.

Note:

- préparer la solution d'acrylamide 20% avec 19g d'acrylamide et 1g de bisacrylamide dans 100 ml d'eau pure stérile.

- Désioniser cette solution an ajoutant 2g d'Amberlite et agiter pendant 10 min.
- Stériliser la solution par filtration
- Stocker la solution à +4C et à l'obscurité.

3- Coulage du gel et migration électrophorétique

- Monter les deux plaques en utilisant les espaceurs et les pinces.
- Couler le gel doucement entre les deux plaques tout en évitant la formation de bulles
- Placer le peigne et maintenir le gel dans une position horizontale
- Laisser polymériser pendant 2 heures minimum
- Enlever le peigne et bien rincer les puis avec de l'eau distillée stérile
- Monter les plaques sur le système d'électrophorèse et bien couvrir les puis avec du TBE 1X
- Déposer les échantillons (produits PCR) et les marqueurs de poids moléculaire.
- Lancer la migration électrophorètique à 200V pendant 16h.

4- Révélation du gel au nitrate d'argent

- Séparer les deux plaques minutieusement.
- Fixer le gel en mettant la petite plaque dans une solution d'éthanol 10% (v/v) pendant 10 min.
- Rincer le gel à l'eau bi-distillée 3 fois pendant 30 s chaque.
- Mettre dans une solution d'acide acétique à 1% (v/v) pendant 3 min
- Rincer à l'eau bi-distillée 3 fois pendant 30 s chaque
- Mettre dans la solution une solution de coloration avec du nitrate d'argent à 0.2% (p/v) pendant 25 min
- Rincer à l'eau bi-distillée 3 fois (30 s chaque)
- Laisser le gel dans la solution de révélation [avec 3% (p/v) de carbonate de sodium et 0.02% (v/v) de formaldehyde (37%)] jusqu'à obtention de l'intensité désiré des bandes
- Arrêter le développement en laissant le gel 10 min dans une solution d'acide acétique glacial (10%) (v/v)
- Rincer le gel à l'eau bi-distillée stérile
- Laisser le gel sécher avant de prendre des photos.

Annexe II. 2: Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	Marqueur	F1	F2	Code	Marqueur	F1	F2
1	ISSR-F1:569 pb	0.046	1.326	42	ISSR-FL1:196 pb	0.140	1.186
2	ISSR-F1:552 bp	0.140	1.186	43	ISSR-FL1:185 pb	1.184	0.436
3	ISSR-F1:478 bp	0.167	0.025	44	ISSR-FL1:165 pb	0.002	0.502
4	ISSR-F1:459 bp	0.323	0.009	45	ISSR-FL1:147 pb	1.184	0.436
5	ISSR-F1:383 bp	0.454	1.293	46	ISSR-FL2:543 pb	0.040	0.417
6	ISSR-F1:269 bp	0.454	1.293	47	ISSR-FL2:526 pb	1.260	0.073
7	ISSR-F1:241 bp	0.454	1.293	48	ISSR-FL2:470 pb	0.102	0.007
8	ISSR-F1:229 bp	0.102	0.007	49	ISSR-FL2:381 pb	0.167	0.025
9	ISSR-F1:192 bp	0.454	1.293	50	ISSR-FL2:359 pb	0.167	0.025
10	ISSR-F1:181 bp	0.040	0.417	51	ISSR-FL2:332 pb	0.454	1.293
11	ISSR-F1:173 bp	0.140	1.186	52	ISSR-FL2:307 pb	0.861	0.522
12	ISSR-F1:159 bp	0.046	1.326	53	ISSR-FL2:278 pb	0.046	1.326
13	ISSR-F1:155 bp	0.140	1.186	54	ISSR-FL2:263 pb	0.140	1.186
14	ISSR-F2:409 bp	0.102	0.007	55	ISSR-FL2:243 pb	0.002	0.502
15	ISSR-F2:318 bp	1.260	0.073	56	ISSR-FL2:243 pb	1.184	0.436
16	ISSR-F2:304 bp	0.040	0.417	57	ISSR-FL2:214 pb	0.861	0.522
17	ISSR-F2:283 bp	0.140	1.186	58	ISSR-FL2:202 pb	1.184	0.436
18	ISSR-F2:272 bp	0.040	0.417	59	ISSR-FL2:183 pb	0.861	0.522
19	ISSR-F2:246 bp	0.102	0.007	60	ISSR-FL2:173 pb	0.140	1.186
20	ISSR-F2:222 bp	0.140	1.186	61	ISSR-FL2:162 pb	0.040	0.417
21	ISSR-F2:212 bp	0.167	0.025	62	ISSR-FL2:150 pb	1.260	0.073
22	ISSR-F2:188 bp	0.454	1.293	63	ISSR-FL2:143 pb	1.645	0.111
23	ISSR-F2:166 bp	0.167	0.025	64	ISSR-FL3:992 pb	0.040	0.417
24	ISSR-F2:151 bp	0.323	0.009	65	ISSR-FL3:865 pb	0.040	0.417
25	ISSR-F2:138 bp	0.230	0.021	66	ISSR-FL3:677 pb	0.046	1.326
26	ISSR-FL1:1126 pb	0.040	0.417	67	ISSR-FL3:582 pb	0.102	0.007
27	ISSR-FL1:655 pb	1.260	0.073	68	ISSR-FL3:504 pb	0.102	0.007
28	ISSR-FL1:626 pb	0.140	1.186	69	ISSR-FL3:463 pb	0.861	0.522
29	ISSR-FL1:569 pb	0.861	0.522	70	ISSR-FL3:414 pb	0.861	0.522
30	ISSR-FL1:497 pb	1.184	0.436	71	ISSR-FL3:389 pb	1.645	0.111
31	ISSR-FL1:496 pb	0.140	1.186	72	ISSR-FL3:364 pb	0.055	0.081
32	ISSR-FL1:445 pb	1.260	0.073	73	ISSR-FL3:345 pb	1.260	0.073
33	ISSR-FL1:422 pb	0.040	0.417	74	ISSR-FL3:334 pb	0.167	0.025
34	ISSR-FL1:392 pb	0.861	0.522	75	ISSR-FL3:299 pb	0.156	0.121
35	ISSR-FL1:379 pb	0.040	0.417	76	ISSR-FL3:278 pb	1.260	0.073
36	ISSR-FL1:350 pb	0.040	0.417	77	ISSR-FL3:253 pb	0.323	0.009
37	ISSR-FL1:311 pb	0.454	1.293	78	ISSR-FL3:238 pb	1.260	0.073
38	ISSR-FL1:286 pb	1.260	0.073	79	ISSR-FL3:228 pb	1.645	0.111
39	ISSR-FL1:269 pb	0.046	1.326	80	ISSR-FL3:197 pb	0.002	0.502
40	ISSR-FL1:256 pb	0.140	1.186	81	ISSR-FL3:194 pb	1.260	0.073
41	ISSR-FL1:239 pb	0.040	0.417	82	ISSR-FL3:169 pb	0.454	1.293

Annexe II. 2 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
83	ISSR-FL3:151 pb	0,861	0,522	124	ISSR-FL6:310 pb	0,454	1,293
84	ISSR-FL3:139 pb	0,454	1,293	125	ISSR-FL6:272 pb	1,260	0,073
85	ISSR-FL4:926 pb	1,260	0,073	126	ISSR-FL6:253 pb	0,055	0,081
86	ISSR-FL4:621 pb	0,230	0,021	127	ISSR-FL6:235 pb	0,454	1,293
87	ISSR-FL4:457 pb	0,140	1,186	128	ISSR-FL6:219 pb	0,040	0,417
88	ISSR-FL4:397 pb	0,140	1,186	129	ISSR-FL6:200 pb	0,454	1,293
89	ISSR-FL4:363 pb	0,046	1,326	130	ISSR-FL6:175 pb	1,260	0,073
90	ISSR-FL4:310 pb	0,140	1,186	131	ISSR-FL6:161 pb	0,102	0,007
91	ISSR-FL4:296 pb	1,260	0,073	132	ISSR-FL6:148 pb	0,002	0,502
92	ISSR-FL4:262 pb	0,230	0,021	133	ISSR-FL6:134 pb	0,454	1,293
93	ISSR-FL4:236 pb	0,454	1,293	134	ISSR-FL6:124 pb	0,040	0,417
94	ISSR-FL4:202 pb	1,260	0,073	135	ISSR-FL7:767 pb	1,260	0,073
95	ISSR-FL4:183 pb	0,454	1,293	136	ISSR-FL7:767 pb	1,260	0,073
96	ISSR-FL4:157 pb	0,046	1,326	137	ISSR-FL7:573 pb	0,861	0,522
97	ISSR-FL4:131 pb	1,260	0,073	138	ISSR-FL7:435 pb	0,102	0,007
98	ISSR-FL5:783 pb	0,140	1,186	139	ISSR-FL7:372 pb	0,454	1,293
99	ISSR-FL5:700 pb	0,102	0,007	140	ISSR-FL7:340 pb	0,002	0,502
100	ISSR-FL5:638 pb	0,040	0,417	141	ISSR-FL7:319 pb	0,167	0,025
101	ISSR-FL5:614 pb	0,140	1,186	142	ISSR-FL7:304 pb	0,323	0,009
102	ISSR-FL5:552 pb	0,140	1,186	143	ISSR-FL7:280 pb	1,184	0,436
103	ISSR-FL5:515 pb	0,055	0,081	144	ISSR-FL7:254 pb	1,260	0,073
104	ISSR-FL5:469 pb	0,040	0,417	145	ISSR-FL7:233 pb	0,040	0,417
105	ISSR-FL5:443 pb	1,260	0,073	146	ISSR-FL7:220 pb	0,861	0,522
106	ISSR-FL5:404 pb	0,140	1,186	147	ISSR-FL7:206 pb	1,184	0,436
107	ISSR-FL5:384 pb	1,260	0,073	148	ISSR-FL7:178 pb	0,861	0,522
108	ISSR-FL5:355 pb	0,040	0,417	149	ISSR-FL7:155 pb	0,230	0,021
109	ISSR-FL5:341 pb	0,140	1,186	150	ISSR-FL9:640 pb	1,260	0,073
110	ISSR-FL5:317 pb	0,055	0,081	151	ISSR-FL9:501 pb	1,260	0,073
111	ISSR-FL5:285 pb	0,454	1,293	152	ISSR-FL9:432 pb	1,260	0,073
112	ISSR-FL5:250 pb	0,156	0,121	153	ISSR-FL9:350 pb	1,260	0,073
113	ISSR-FL5:192 pb	0,454	1,293	154	ISSR-FL9:324 pb	1,184	0,436
114	ISSR-FL5:163 pb	0,454	1,293	155	ISSR-FL9:300 pb	0,861	0,522
115	ISSR-FL5:142 pb	0,454	1,293	156	ISSR-FL9:264 pb	0,454	1,293
116	ISSR-FL6:817 pb	1,260	0,073	157	ISSR-FL9:239 pb	0,323	0,009
117	ISSR-FL6:768 pb	1,260	0,073	158	ISSR-FL9:218 pb	0,230	0,021
118	ISSR-FL6:635 pb	1,260	0,073	159	ISSR-FL9:186 pb	0,002	0,502
119	ISSR-FL6:539 pb	1,184	0,436	160	ISSR-FL9:157 pb	0,454	1,293
120	ISSR-FL6:500 pb	1,260	0,073	161	ISSR-FL9:133 pb	0,046	1,326
121	ISSR-FL6:467 pb	1,184	0,436	162	ISSR-FL9:120 pb	0,140	1,186
122	ISSR-FL6:415 pb	1,645	0,111	163	ISSR-FL9:110 pb	0,046	1,326
123	ISSR-FL6:362 pb	0,156	0,121	164	ISSR-FL12:873 pb	0,140	1,186

Annexe II. 2 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
165	ISSR-FL12:776 pb	1,645	0,111	176	ISSR-FL12:234 pb	1,260	0,073
166	ISSR-FL12:646 pb	0,140	1,186	177	ISSR-FL12:217 pb	1,184	0,436
167	ISSR-FL12:612 pb	1,184	0,436	178	ISSR-FL12:212 pb	0,454	1,293
168	ISSR-FL12:551 pb	0,140	1,186	179	ISSR-FL12:199 pb	1,260	0,073
169	ISSR-FL12:429 pb	0,102	0,007	180	ISSR-FL12:183 pb	1,645	0,111
170	ISSR-FL12:400 pb	0,454	1,293	181	ISSR-FL12:171 pb	1,260	0,073
171	ISSR-FL12:355 pb	1,260	0,073	182	ISSR-FL12:159 pb	1,184	0,436
172	ISSR-FL12:323 pb	0,156	0,121	183	ISSR-FL12:149 pb	0,861	0,522
173	ISSR-FL12:310 pb	0,454	1,293	184	ISSR-FL12:126 pb	0,140	1,186
174	ISSR-FL12:287 pb	0,102	0,007	185	ISSR-FL12:256 pb	0,230	0,021
175	ISSR-FL12:256 pb	0,230	0,021				

Annexe II. 3 : Contribution des marqueurs AFLP dans les deux axes F1 et F2 de l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
1	E-ACC M-CAG:1163 pb	0,235	0,237	43	E-ACC M-CAG:204 pb	0,236	0,383
2	E-ACC M-CAG:1126 pb	0,007	0,487	44	E-ACC M-CAG:204 pb	0,060	0,006
3	E-ACC M-CAG:1031 pb	0,002	0,238	45	E-ACC M-CAG:195 pb	0,041	0,025
4	E-ACC M-CAG:975 pb	0,661	0,000	46	E-ACC M-CAG:189 pb	0,025	0,018
5	E-ACC M-CAG:975 pb	0,235	0,237	47	E-ACC M-CAG:180 pb	0,135	0,018
6	E-ACC M-CAG:910 pb	0,025	0,018	48	E-ACC M-CAG:159 pb	0,594	0,006
7	E-ACC M-CAG:841 pb	0,235	0,237	49	E-ACC M-CAG:155 pb	0,016	0,606
8	E-ACC M-CAG:818 pb	0,060	0,006	50	E-ACC M-CAT:1459 pb	0,016	0,606
9	E-ACC M-CAG:747 pb	0,002	0,238	51	E-ACC M-CAT:1390 pb	0,025	0,018
10	E-ACC M-CAG:721 pb	0,236	0,383	52	E-ACC M-CAT:1316 pb	0,016	0,606
11	E-ACC M-CAG:721 pb	0,235	0,237	53	E-ACC M-CAT:1174 pb	0,235	0,237
12	E-ACC M-CAG:676 pb	0,060	0,006	54	E-ACC M-CAT:1111 pb	0,135	0,018
13	E-ACC M-CAG:626 pb	0,235	0,237	55	E-ACC M-CAT:1019 pb	0,135	0,018
14	E-ACC M-CAG:596 pb	0,002	0,238	56	E-ACC M-CAT:943 pb	0,007	0,487
15	E-ACC M-CAG:576 pb	0,016	0,606	57	E-ACC M-CAT:882 pb	0,040	0,003
16	E-ACC M-CAG:525 pb	0,135	0,018	58	E-ACC M-CAT:832 pb	0,007	0,487
17	E-ACC M-CAG:503 pb	0,594	0,006	59	E-ACC M-CAT:759 pb	0,007	0,487
18	E-ACC M-CAG:483 pb	0,040	0,003	60	E-ACC M-CAT:724 pb	0,040	0,003
19	E-ACC M-CAG:455 pb	0,135	0,018	61	E-ACC M-CAT:704 pb	0,007	0,166
20	E-ACC M-CAG:426 pb	0,661	0,000	62	E-ACC M-CAT:661 pb	0,002	0,238
21	E-ACC M-CAG:412 pb	0,661	0,000	63	E-ACC M-CAT:639 pb	0,278	0,321
22	E-ACC M-CAG:391 pb	0,135	0,018	64	E-ACC M-CAT:606 pb	0,007	0,166
23	E-ACC M-CAG:383 pb	0,661	0,000	65	E-ACC M-CAT:606 pb	0,007	0,166
24	E-ACC M-CAG:362 pb	0,236	0,383	66	E-ACC M-CAT:583 pb	0,025	0,018
25	E-ACC M-CAG:346 pb	0,594	0,006	67	E-ACC M-CAT:564 pb	0,661	0,000
26	E-ACC M-CAG:344 pb	0,007	0,166	68	E-ACC M-CAT:511 pb	0,007	0,487
27	E-ACC M-CAG:340 pb	0,025	0,018	69	E-ACC M-CAT:488 pb	0,278	0,321
28	E-ACC M-CAG:330 pb	0,235	0,237	70	E-ACC M-CAT:467 pb	0,135	0,018
29	E-ACC M-CAG:322 pb	0,007	0,487	71	E-ACC M-CAT:446 pb	0,016	0,606
30	E-ACC M-CAG:308 pb	0,235	0,237	72	E-ACC M-CAT:424 pb	0,661	0,000
31	E-ACC M-CAG:295 pb	0,007	0,487	73	E-ACC M-CAT:410 pb	0,007	0,487
32	E-ACC M-CAG:295 pb	0,196	0,489	74	E-ACC M-CAT:370 pb	0,135	0,018
33	E-ACC M-CAG:284 pb	0,661	0,000	75	E-ACC M-CAT:358 pb	0,661	0,000
34	E-ACC M-CAG:272 pb	0,236	0,383	76	E-ACC M-CAT:349 pb	0,661	0,000
35	E-ACC M-CAG:272 pb	0,594	0,006	77	E-ACC M-CAT:340 pb	0,236	0,383
36	E-ACC M-CAG:263 pb	0,007	0,487	78	E-ACC M-CAT:326 pb	0,135	0,018
37	E-ACC M-CAG:252 pb	0,236	0,383	79	E-ACC M-CAT:315 pb	0,594	0,006
38	E-ACC M-CAG:243 pb	0,060	0,006	80	E-ACC M-CAT:306 pb	0,236	0,383
39	E-ACC M-CAG:232 pb	0,235	0,237	81	E-ACC M-CAT:296 pb	0,007	0,166
40	E-ACC M-CAG:226 pb	0,661	0,000	82	E-ACC M-CAT:281 pb	0,007	0,487
41	E-ACC M-CAG:215 pb	0,007	0,487	83	E-ACC M-CAT:276 pb	0,007	0,166
42	E-ACC M-CAG:210 pb	0,661	0,000	84	E-ACC M-CAT:270 pb	0,007	0,166

Annexe II. 3 (suite): Contribution des marqueurs AFLP dans les deux axes F1 et F2 de l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Ccontributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
85	E-ACC M-CAT:265 pb	0,594	0,006	127	E-ACC M-CTA:403 pb	0,016	0,606
86	E-ACC M-CAT:251 pb	0,661	0,000	128	E-ACC M-CTA:382 pb	0,235	0,237
87	E-ACC M-CAT:241 pb	0,135	0,018	129	E-ACC M-CTA:382 pb	0,007	0,166
88	E-ACC M-CAT:233 pb	0,016	0,606	130	E-ACC M-CTA:366 pb	0,007	0,487
89	E-ACC M-CAT:208 pb	0,135	0,018	131	E-ACC M-CTA:354 pb	0,007	0,487
90	E-ACC M-CAT:193 pb	0,594	0,006	132	E-ACC M-CTA:342 pb	0,002	0,238
91	E-ACC M-CAT:186 pb	0,661	0,000	133	E-ACC M-CTA:336 pb	0,040	0,003
92	E-ACC M-CAT:177 pb	0,040	0,003	134	E-ACC M-CTA:325 pb	0,661	0,000
93	E-ACC M-CAT:172 pb	0,235	0,237	135	E-ACC M-CTA:318 pb	0,661	0,000
94	E-ACC M-CAT:167 pb	0,661	0,000	136	E-ACC M-CTA:313 pb	0,007	0,487
95	E-ACC M-CAT:159 pb	0,016	0,606	137	E-ACC M-CTA:306 pb	0,060	0,006
96	E-ACC M-CAT:152 pb	0,007	0,487	138	E-ACC M-CTA:283 pb	0,594	0,006
97	E-ACC M-CAT:148 pb	0,661	0,000	139	E-ACC M-CTA:273 pb	0,661	0,000
98	E-ACC M-CAT:146 pb	0,007	0,166	140	E-ACC M-CTA:267 pb	0,278	0,321
99	E-ACC M-CAT:142 pb	0,661	0,000	141	E-ACC M-CTA:252 pb	0,235	0,237
100	E-ACC M-CAT:138 pb	0,235	0,237	142	E-ACC M-CTA:243 pb	0,235	0,237
101	E-ACC M-CAT:134 pb	0,235	0,237	143	E-ACC M-CTA:234 pb	0,016	0,606
102	E-ACC M-CAT:131 pb	0,661	0,000	144	E-ACC M-CTA:224 pb	0,016	0,606
103	E-ACC M-CTA:1060 pb	0,235	0,237	145	E-ACC M-CTA:214 pb	0,040	0,003
104	E-ACC M-CTA:1014 pb	0,002	0,238	146	E-ACC M-CTA:208 pb	0,661	0,000
105	E-ACC M-CTA:1008 pb	0,041	0,025	147	E-ACC M-CTA:191 pb	0,060	0,006
106	E-ACC M-CTA:987 pb	0,060	0,006	148	E-ACC M-CTA:176 pb	0,135	0,018
107	E-ACC M-CTA:961 pb	0,040	0,003	149	E-ACC M-CTA:173 pb	0,235	0,237
108	E-ACC M-CTA:906 pb	0,235	0,237	150	E-ACC M-CTA:170 pb	0,040	0,003
109	E-ACC M-CTA:866 pb	0,594	0,006	151	E-ACC M-CTA:165 pb	0,235	0,237
110	E-ACC M-CTA:829 pb	0,007	0,487	152	E-ACC M-CTA:165 pb	0,196	0,489
111	E-ACC M-CTA:805 pb	0,025	0,018	153	E-ACC M-CTA:155 pb	0,040	0,003
112	E-ACC M-CTA:758 pb	0,594	0,006	154	E-ACC M-CTA:145 pb	0,002	0,238
113	E-ACC M-CTA:728 pb	0,135	0,018	155	E-ACC M-CTA:144 pb	0,235	0,237
114	E-ACC M-CTA:718 pb	0,016	0,606	156	E-ACC M-CTA:141 pb	0,235	0,237
115	E-ACC M-CTA:690 pb	0,661	0,000	157	E-ACC M-CTA:136 pb	0,235	0,237
116	E-ACC M-CTA:665 pb	0,025	0,018	158	E-ACG M-CAC:971 pb	0,594	0,006
117	E-ACC M-CTA:613 pb	0,025	0,018	159	E-ACG M-CAC:929 pb	0,235	0,237
118	E-ACC M-CTA:577 pb	0,060	0,006	160	E-ACG M-CAC:888 pb	0,025	0,018
119	E-ACC M-CTA:539 pb	0,135	0,018	161	E-ACG M-CAC:848 pb	0,007	0,487
120	E-ACC M-CTA:517 pb	0,661	0,000	162	E-ACG M-CAC:841 pb	0,025	0,018
121	E-ACC M-CTA:490 pb	0,235	0,237	163	E-ACG M-CAC:815 pb	0,278	0,321
122	E-ACC M-CTA:476 pb	0,040	0,003	164	E-ACG M-CAC:788 pb	0,196	0,489
123	E-ACC M-CTA:456 pb	0,661	0,000	165	E-ACG M-CAC:724 pb	0,060	0,006
124	E-ACC M-CTA:437 pb	0,135	0,018	166	E-ACG M-CAC:692 pb	0,661	0,000
125	E-ACC M-CTA:428 pb	0,025	0,018	167	E-ACG M-CAC:635 pb	0,007	0,166
126	E-ACC M-CTA:415 pb	0,007	0,166	168	E-ACG M-CAC:585 pb	0,236	0,383

Annexe II. 3 (suite): Contribution des marqueurs AFLP dans les deux axes F1 et F2 de l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
169	E-ACG M-CAC:570 pb	0,007	0,487	211	E-ACG M-CAG:496 pb	0,007	0,166
170	E-ACG M-CAC:516 pb	0,002	0,238	212	E-ACG M-CAG:468 pb	0,016	0,606
171	E-ACG M-CAC:492 pb	0,236	0,383	213	E-ACG M-CAG:450 pb	0,007	0,166
172	E-ACG M-CAC:472 pb	0,235	0,237	214	E-ACG M-CAG:442 pb	0,040	0,003
173	E-ACG M-CAC:446 pb	0,236	0,383	215	E-ACG M-CAG:422 pb	0,025	0,018
174	E-ACG M-CAC:435 pb	0,661	0,000	216	E-ACG M-CAG:407 pb	0,016	0,606
175	E-ACG M-CAC:430 pb	0,235	0,237	217	E-ACG M-CAG:391 pb	0,661	0,000
176	E-ACG M-CAC:407 pb	0,236	0,383	218	E-ACG M-CAG:382 pb	0,007	0,166
177	E-ACG M-CAC:385 pb	0,007	0,487	219	E-ACG M-CAG:367 pb	0,135	0,018
178	E-ACG M-CAC:371 pb	0,025	0,018	220	E-ACG M-CAG:353 pb	0,041	0,025
179	E-ACG M-CAC:361 pb	0,025	0,018	221	E-ACG M-CAG:333 pb	0,040	0,003
180	E-ACG M-CAC:353 pb	0,594	0,006	222	E-ACG M-CAG:321 pb	0,594	0,006
181	E-ACG M-CAC:344 pb	0,278	0,321	223	E-ACG M-CAG:311 pb	0,594	0,006
182	E-ACG M-CAC:343 pb	0,016	0,606	224	E-ACG M-CAG:296 pb	0,278	0,321
183	E-ACG M-CAC:327 pb	0,016	0,606	225	E-ACG M-CAG:282 pb	0,041	0,025
184	E-ACG M-CAC:317 pb	0,060	0,006	226	E-ACG M-CAG:275 pb	0,235	0,237
185	E-ACG M-CAC:311 pb	0,661	0,000	227	E-ACG M-CAG:270 pb	0,661	0,000
186	E-ACG M-CAC:303 pb	0,594	0,006	228	E-ACG M-CAG:263 pb	0,235	0,237
187	E-ACG M-CAC:302 pb	0,060	0,006	229	E-ACG M-CAG:252 pb	0,135	0,018
188	E-ACG M-CAC:285 pb	0,041	0,025	230	E-ACG M-CAG:234 pb	0,040	0,003
189	E-ACG M-CAC:276 pb	0,025	0,018	231	E-ACG M-CAG:219 pb	0,016	0,606
190	E-ACG M-CAC:276 pb	0,235	0,237	232	E-ACG M-CAG:212 pb	0,135	0,018
191	E-ACG M-CAC:256 pb	0,007	0,166	233	E-ACG M-CAG:208 pb	0,196	0,489
192	E-ACG M-CAC:243 pb	0,135	0,018	234	E-ACG M-CAG:202 pb	0,236	0,383
193	E-ACG M-CAC:238 pb	0,007	0,166	235	E-ACG M-CAG:190 pb	0,196	0,489
194	E-ACG M-CAC:225 pb	0,594	0,006	236	E-ACG M-CAG:186 pb	0,007	0,166
195	E-ACG M-CAC:221 pb	0,278	0,321	237	E-ACG M-CAG:181 pb	0,236	0,383
196	E-ACG M-CAC:208 pb	0,135	0,018	238	E-ACG M-CAG:177 pb	0,661	0,000
197	E-ACG M-CAC:197 pb	0,135	0,018	239	E-ACG M-CAG:172 pb	0,236	0,383
198	E-ACG M-CAC:182 pb	0,135	0,018	240	E-ACG M-CAG:166 pb	0,007	0,166
199	E-ACG M-CAC:173 pb	0,196	0,489	241	E-ACG M-CAG:150 pb	0,196	0,489
200	E-ACG M-CAC:168 pb	0,661	0,000	242	E-ACG M-CAG:150 pb	0,025	0,018
201	E-ACG M-CAC:157 pb	0,661	0,000	243	E-ACG M-CAG:144 pb	0,236	0,383
202	E-ACG M-CAC:146 pb	0,661	0,000	244	E-ACG M-CAT:1047 pb	0,135	0,018
203	E-ACG M-CAC:141 pb	0,594	0,006	245	E-ACG M-CAT:987 pb	0,002	0,238
204	E-ACG M-CAC:131 pb	0,661	0,000	246	E-ACG M-CAT:906 pb	0,236	0,383
205	E-ACG M-CAG:861 pb	0,016	0,606	247	E-ACG M-CAT:855 pb	0,041	0,025
206	E-ACG M-CAG:711 pb	0,041	0,025	248	E-ACG M-CAT:805 pb	0,007	0,166
207	E-ACG M-CAG:662 pb	0,235	0,237	249	E-ACG M-CAT:773 pb	0,135	0,018
208	E-ACG M-CAG:632 pb	0,135	0,018	250	E-ACG M-CAT:700 pb	0,135	0,018
209	E-ACG M-CAG:568 pb	0,002	0,238	251	E-ACG M-CAT:631 pb	0,002	0,238
210	E-ACG M-CAG:523 pb	0,041	0,025				

Annexe II. 3 (suite): Contribution des marqueurs AFLP dans les deux axes F1 et F2 de l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
252	E-ACG M-CAT:584 pb	0,040	0,003	294	E-ACT M-CAC:1895 pb	0,016	0,606
253	E-ACG M-CAT:563 pb	0,661	0,000	295	E-ACT M-CAC:1706 pb	0,016	0,606
254	E-ACG M-CAT:543 pb	0,278	0,321	296	E-ACT M-CAC:1599 pb	0,025	0,018
255	E-ACG M-CAT:508 pb	0,135	0,018	297	E-ACT M-CAC:1460 pb	0,040	0,003
256	E-ACG M-CAT:489 pb	0,007	0,487	298	E-ACT M-CAC:1380 pb	0,025	0,018
257	E-ACG M-CAT:475 pb	0,040	0,003	299	E-ACT M-CAC:1139 pb	0,135	0,018
258	E-ACG M-CAT:448 pb	0,025	0,018	300	E-ACT M-CAC:1043 pb	0,236	0,383
259	E-ACG M-CAT:432 pb	0,196	0,489	301	E-ACT M-CAC:886 pb	0,135	0,018
260	E-ACG M-CAT:417 pb	0,278	0,321	302	E-ACT M-CAC:809 pb	0,040	0,003
261	E-ACG M-CAT:405 pb	0,007	0,487	303	E-ACT M-CAC:739 pb	0,594	0,006
262	E-ACG M-CAT:399 pb	0,041	0,025	304	E-ACT M-CAC:659 pb	0,278	0,321
263	E-ACG M-CAT:384 pb	0,594	0,006	305	E-ACT M-CAC:603 pb	0,007	0,166
264	E-ACG M-CAT:367 pb	0,235	0,237	306	E-ACT M-CAC:575 pb	0,135	0,018
265	E-ACG M-CAT:353 pb	0,002	0,238	307	E-ACT M-CAC:544 pb	0,025	0,018
266	E-ACG M-CAT:345 pb	0,007	0,166	308	E-ACT M-CAC:513 pb	0,040	0,003
267	E-ACG M-CAT:327 pb	0,041	0,025	309	E-ACT M-CAC:477 pb	0,278	0,321
268	E-ACG M-CAT:318 pb	0,025	0,018	310	E-ACT M-CAC:447 pb	0,135	0,018
269	E-ACG M-CAT:308 pb	0,236	0,383	311	E-ACT M-CAC:407 pb	0,002	0,238
270	E-ACG M-CAT:299 pb	0,025	0,018	312	E-ACT M-CAC:381 pb	0,278	0,321
271	E-ACG M-CAT:285 pb	0,236	0,383	313	E-ACT M-CAC:364 pb	0,236	0,383
272	E-ACG M-CAT:278 pb	0,025	0,018	314	E-ACT M-CAC:360 pb	0,007	0,166
273	E-ACG M-CAT:268 pb	0,661	0,000	315	E-ACT M-CAC:333 pb	0,661	0,000
274	E-ACG M-CAT:257 pb	0,007	0,166	316	E-ACT M-CAC:318 pb	0,016	0,606
275	E-ACG M-CAT:253 pb	0,278	0,321	317	E-ACT M-CAC:311 pb	0,002	0,238
276	E-ACG M-CAT:249 pb	0,236	0,383	318	E-ACT M-CAC:300 pb	0,661	0,000
277	E-ACG M-CAT:242 pb	0,594	0,006	319	E-ACT M-CAC:280 pb	0,060	0,006
278	E-ACG M-CAT:234 pb	0,236	0,383	320	E-ACT M-CAC:264 pb	0,661	0,000
279	E-ACG M-CAT:229 pb	0,661	0,000	321	E-ACT M-CAC:253 pb	0,002	0,238
280	E-ACG M-CAT:218 pb	0,007	0,166	322	E-ACT M-CAC:237 pb	0,236	0,383
281	E-ACG M-CAT:212 pb	0,025	0,018	323	E-ACT M-CAC:228 pb	0,007	0,166
282	E-ACG M-CAT:203 pb	0,135	0,018	324	E-ACT M-CAC:222 pb	0,236	0,383
283	E-ACG M-CAT:198 pb	0,007	0,166	325	E-ACT M-CAC:214 pb	0,002	0,238
284	E-ACG M-CAT:191 pb	0,060	0,006	326	E-ACT M-CAC:211 pb	0,661	0,000
285	E-ACG M-CAT:182 pb	0,135	0,018	327	E-ACT M-CAC:203 pb	0,661	0,000
286	E-ACG M-CAT:166 pb	0,007	0,487	328	E-ACT M-CAC:196 pb	0,196	0,489
287	E-ACG M-CAT:157 pb	0,007	0,487	329	E-ACT M-CAC:187 pb	0,040	0,003
288	E-ACG M-CAT:156 pb	0,025	0,018	330	E-ACT M-CAC:176 pb	0,235	0,237
289	E-ACG M-CAT:147 pb	0,236	0,383	331	E-ACT M-CAC:171 pb	0,016	0,606
290	E-ACG M-CAT:144 pb	0,196	0,489	332	E-ACT M-CAC:162 pb	0,135	0,018
291	E-ACG M-CAT:142 pb	0,661	0,000	333	E-ACT M-CAC:154 pb	0,661	0,000
292	E-ACG M-CAT:138 pb	0,661	0,000	334	E-ACT M-CAC:150 pb	0,196	0,489
293	E-ACG M-CAT:132 pb	0,661	0,000	335	E-ACT M-CAC:149 pb	0,025	0,018

Annexe II. 3 (suite): Contribution des marqueurs AFLP dans les deux axes F1 et F2 de l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	Marqueur	F1	F2	Code	Marqueur	F1	F2
336	E-ACT M-CAC:142 pb	0,135	0,018	378	E-ACT M-CAG:235 pb	0,135	0,018
337	E-ACT M-CAG:1643 pb	0,025	0,018	379	E-ACT M-CAG:227 pb	0,002	0,238
338	E-ACT M-CAG:1319 pb	0,196	0,489	380	E-ACT M-CAG:222 pb	0,007	0,487
339	E-ACT M-CAG:1235 pb	0,025	0,018	381	E-ACT M-CAG:214 pb	0,041	0,025
340	E-ACT M-CAG:1126 pb	0,594	0,006	382	E-ACT M-CAG:213 pb	0,236	0,383
341	E-ACT M-CAG:1042 pb	0,016	0,606	383	E-ACT M-CAG:203 pb	0,135	0,018
342	E-ACT M-CAG:963 pb	0,040	0,003	384	E-ACT M-CAG:197 pb	0,661	0,000
343	E-ACT M-CAG:900 pb	0,135	0,018	385	E-ACT M-CAG:190 pb	0,236	0,383
344	E-ACT M-CAG:865 pb	0,007	0,487	386	E-ACT M-CAG:184 pb	0,661	0,000
345	E-ACT M-CAG:826 pb	0,016	0,606	387	E-ACT M-CAG:179 pb	0,135	0,018
346	E-ACT M-CAG:780 pb	0,236	0,383	388	E-ACT M-CAG:174 pb	0,016	0,606
347	E-ACT M-CAG:735 pb	0,002	0,238	389	E-ACT M-CAG:166 pb	0,594	0,006
348	E-ACT M-CAG:691 pb	0,040	0,003	390	E-ACT M-CAG:161 pb	0,025	0,018
349	E-ACT M-CAG:664 pb	0,002	0,238	391	E-ACT M-CAG:158 pb	0,060	0,006
350	E-ACT M-CAG:627 pb	0,594	0,006	392	E-ACT M-CAG:153 pb	0,594	0,006
351	E-ACT M-CAG:587 pb	0,002	0,238	393	E-ACT M-CAG:146 pb	0,236	0,383
352	E-ACT M-CAG:567 pb	0,236	0,383	394	E-ACT M-CAG:141 pb	0,135	0,018
353	E-ACT M-CAG:565 pb	0,060	0,006	395	E-ACT M-CAT:1690 pb	0,594	0,006
354	E-ACT M-CAG:549 pb	0,016	0,606	396	E-ACT M-CAT:1595 pb	0,025	0,018
355	E-ACT M-CAG:525 pb	0,007	0,166	397	E-ACT M-CAT:1572 pb	0,135	0,018
356	E-ACT M-CAG:512 pb	0,007	0,487	398	E-ACT M-CAT:1456 pb	0,135	0,018
357	E-ACT M-CAG:499 pb	0,196	0,489	399	E-ACT M-CAT:1429 pb	0,007	0,166
358	E-ACT M-CAG:478 pb	0,135	0,018	400	E-ACT M-CAT:1348 pb	0,002	0,238
359	E-ACT M-CAG:455 pb	0,196	0,489	401	E-ACT M-CAT:1305 pb	0,278	0,321
360	E-ACT M-CAG:446 pb	0,025	0,018	402	E-ACT M-CAT:1226 pb	0,135	0,018
361	E-ACT M-CAG:432 pb	0,135	0,018	403	E-ACT M-CAT:1166 pb	0,016	0,606
362	E-ACT M-CAG:414 pb	0,235	0,237	404	E-ACT M-CAT:1118 pb	0,016	0,606
363	E-ACT M-CAG:398 pb	0,661	0,000	405	E-ACT M-CAT:1060 pb	0,041	0,025
364	E-ACT M-CAG:398 pb	0,236	0,383	406	E-ACT M-CAT:1010 pb	0,002	0,238
365	E-ACT M-CAG:381 pb	0,135	0,018	407	E-ACT M-CAT:968 pb	0,196	0,489
366	E-ACT M-CAG:367 pb	0,135	0,018	408	E-ACT M-CAT:922 pb	0,278	0,321
367	E-ACT M-CAG:356 pb	0,236	0,383	409	E-ACT M-CAT:886 pb	0,235	0,237
368	E-ACT M-CAG:341 pb	0,002	0,238	410	E-ACT M-CAT:881 pb	0,041	0,025
369	E-ACT M-CAG:323 pb	0,135	0,018	411	E-ACT M-CAT:849 pb	0,002	0,238
370	E-ACT M-CAG:309 pb	0,236	0,383	412	E-ACT M-CAT:811 pb	0,007	0,166
371	E-ACT M-CAG:301 pb	0,002	0,238	413	E-ACT M-CAT:780 pb	0,661	0,000
372	E-ACT M-CAG:287 pb	0,025	0,018	414	E-ACT M-CAT:743 pb	0,594	0,006
373	E-ACT M-CAG:276 pb	0,135	0,018	415	E-ACT M-CAT:713 pb	0,040	0,003
374	E-ACT M-CAG:267 pb	0,661	0,000	416	E-ACT M-CAT:694 pb	0,196	0,489
375	E-ACT M-CAG:258 pb	0,002	0,238	417	E-ACT M-CAT:666 pb	0,278	0,321
376	E-ACT M-CAG:253 pb	0,007	0,487	418	E-ACT M-CAT:644 pb	0,002	0,238
377	E-ACT M-CAG:245 pb	0,594	0,006	419	E-ACT M-CAT:606 pb	0,007	0,487

Annexe II. 3 (suite): Contribution des marqueurs AFLP dans les deux axes F1 et F2 de l`ACP réalisée dans l`analyse interspécifique.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
420	E-ACT M-CAT:577 pb	0,196	0,489	465	E-ACT M-CAT:157 pb	0,236	0,383
421	E-ACT M-CAT:562 pb	0,016	0,606	466	E-ACT M-CAT:151 pb	0,002	0,238
422	E-ACT M-CAT:530 pb	0,002	0,238	467	E-ACT M-CAT:138 pb	0,135	0,018
423	E-ACT M-CAT:514 pb	0,040	0,003	468	E-AGG M-CTC:2709 pb	0,007	0,166
424	E-ACT M-CAT:497 pb	0,594	0,006	469	E-AGG M-CTC:2343 pb	0,235	0,237
425	E-ACT M-CAT:488 pb	0,236	0,383	470	E-AGG M-CTC:2157 pb	0,016	0,606
426	E-ACT M-CAT:471 pb	0,007	0,166	471	E-AGG M-CTC:1827 pb	0,661	0,000
427	E-ACT M-CAT:460 pb	0,594	0,006	472	E-AGG M-CTC:1614 pb	0,041	0,025
428	E-ACT M-CAT:448 pb	0,040	0,003	473	E-AGG M-CTC:1455 pb	0,060	0,006
429	E-ACT M-CAT:433 pb	0,196	0,489	474	E-AGG M-CTC:1251 pb	0,594	0,006
430	E-ACT M-CAT:425 pb	0,041	0,025	475	E-AGG M-CTC:1095 pb	0,661	0,000
431	E-ACT M-CAT:409 pb	0,196	0,489	476	E-AGG M-CTC:1000 pb	0,135	0,018
432	E-ACT M-CAT:401 pb	0,016	0,606	477	E-AGG M-CTC:922 pb	0,016	0,606
433	E-ACT M-CAT:395 pb	0,016	0,606	478	E-AGG M-CTC:863 pb	0,661	0,000
434	E-ACT M-CAT:382 pb	0,661	0,000	479	E-AGG M-CTC:813 pb	0,594	0,006
435	E-ACT M-CAT:372 pb	0,016	0,606	480	E-AGG M-CTC:755 pb	0,594	0,006
436	E-ACT M-CAT:370 pb	0,040	0,003	481	E-AGG M-CTC:716 pb	0,025	0,018
437	E-ACT M-CAT:361 pb	0,007	0,487	482	E-AGG M-CTC:675 pb	0,196	0,489
438	E-ACT M-CAT:351 pb	0,041	0,025	483	E-AGG M-CTC:577 pb	0,278	0,321
439	E-ACT M-CAT:341 pb	0,002	0,238	484	E-AGG M-CTC:534 pb	0,278	0,321
440	E-ACT M-CAT:335 pb	0,594	0,006	485	E-AGG M-CTC:498 pb	0,135	0,018
441	E-ACT M-CAT:328 pb	0,235	0,237	486	E-AGG M-CTC:473 pb	0,016	0,606
442	E-ACT M-CAT:325 pb	0,007	0,166	487	E-AGG M-CTC:430 pb	0,135	0,018
443	E-ACT M-CAT:315 pb	0,007	0,487	488	E-AGG M-CTC:375 pb	0,040	0,003
444	E-ACT M-CAT:298 pb	0,007	0,166	489	E-AGG M-CTC:362 pb	0,016	0,606
445	E-ACT M-CAT:282 pb	0,196	0,489	490	E-AGG M-CTC:353 pb	0,025	0,018
446	E-ACT M-CAT:280 pb	0,016	0,606	491	E-AGG M-CTC:338 pb	0,016	0,606
447	E-ACT M-CAT:276 pb	0,002	0,238	492	E-AGG M-CTC:324 pb	0,278	0,321
448	E-ACT M-CAT:270 pb	0,594	0,006	493	E-AGG M-CTC:303 pb	0,235	0,237
449	E-ACT M-CAT:261 pb	0,007	0,487	494	E-AGG M-CTC:290 pb	0,007	0,487
450	E-ACT M-CAT:251 pb	0,025	0,018	495	E-AGG M-CTC:275 pb	0,025	0,018
451	E-ACT M-CAT:245 pb	0,196	0,489	496	E-AGG M-CTC:268 pb	0,016	0,606
452	E-ACT M-CAT:237 pb	0,060	0,006	497	E-AGG M-CTC:257 pb	0,002	0,238
453	E-ACT M-CAT:230 pb	0,196	0,489	498	E-AGG M-CTC:222 pb	0,278	0,321
454	E-ACT M-CAT:219 pb	0,235	0,237	499	E-AGG M-CTC:213 pb	0,594	0,006
455	E-ACT M-CAT:216 pb	0,002	0,238	500	E-AGG M-CTC:206 pb	0,007	0,487
456	E-ACT M-CAT:213 pb	0,196	0,489	501	E-AGG M-CTC:195 pb	0,661	0,000
457	E-ACT M-CAT:209 pb	0,041	0,025	502	E-AGG M-CTC:184 pb	0,007	0,487
458	E-ACT M-CAT:197 pb	0,235	0,237	503	E-AGG M-CTC:172 pb	0,016	0,606
459	E-ACT M-CAT:185 pb	0,025	0,018	504	E-AGG M-CTC:166 pb	0,594	0,006
460	E-ACT M-CAT:178 pb	0,016	0,606	505	E-AGG M-CTC:161 pb	0,661	0,000
461	E-ACT M-CAT:175 pb	0,594	0,006	506	E-AGG M-CTC:154 pb	0,016	0,606
462	E-ACT M-CAT:169 pb	0,278	0,321	507	E-AGG M-CTC:149 pb	0,007	0,487
463	E-ACT M-CAT:167 pb	0,196	0,489				
464	E-ACT M-CAT:163 pb	0,135	0,018				

Annexe II.4. Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. albus*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
1	ISSR-F2:378 pb	0,078	0,083	44	ISSR-F3:284 pb	0,234	0,354
2	ISSR-F2:366 pb	0,099	0,023	45	ISSR-F3:265 pb	0,002	0,047
3	ISSR-F2:358 pb	0,001	0,342	46	ISSR-F3:236 pb	1,502	0,055
4	ISSR-F2:347 pb	0,338	0,145	47	ISSR-F3:226 pb	0,441	0,000
5	ISSR-F2:333 pb	0,890	0,287	48	ISSR-F3:210 pb	1,502	0,055
6	ISSR-F2:322 pb	0,335	0,021	49	ISSR-F3:195 pb	0,132	0,042
7	ISSR-F2:308 pb	0,044	0,094	50	ISSR-F4:2928 pb	0,637	0,915
8	ISSR-F2:292 pb	1,795	0,225	51	ISSR-F4:2662 pb	0,056	1,413
9	ISSR-F2:270 pb	0,000	0,073	52	ISSR-F4:1453 pb	0,637	0,915
10	ISSR-F2:255 pb	0,318	0,252	53	ISSR-F4:1057 pb	1,795	0,225
11	ISSR-F2:247 pb	0,280	0,026	54	ISSR-F4:911 pb	0,231	0,014
12	ISSR-F2:234 pb	0,028	0,000	55	ISSR-F4:867 pb	0,198	0,072
13	ISSR-F2:223 pb	0,341	0,485	56	ISSR-F4:745 pb	1,580	0,008
14	ISSR-F2:212 pb	0,484	0,020	57	ISSR-F4:661 pb	0,000	0,377
15	ISSR-F2:189 pb	0,318	0,252	58	ISSR-F4:638 pb	0,048	0,506
16	ISSR-F2:175 pb	0,455	0,067	59	ISSR-F4:606 pb	0,010	0,113
17	ISSR-F2:148 pb	0,156	0,003	60	ISSR-F4:584 pb	0,252	0,220
18	ISSR-F2:142 pb	0,050	0,003	61	ISSR-F4:517 pb	0,003	0,356
19	ISSR-F2:138 pb	0,059	0,157	62	ISSR-F4:496 pb	0,046	0,260
20	ISSR-F3:1276 pb	0,245	0,235	63	ISSR-F4:496 pb	0,335	0,021
21	ISSR-F3:1164 pb	0,175	0,007	64	ISSR-F4:475 pb	0,109	0,248
22	ISSR-F3:1039 pb	0,082	0,531	65	ISSR-F4:398 pb	0,558	0,485
23	ISSR-F3:872 pb	0,176	0,007	66	ISSR-F4:380 pb	0,009	0,471
24	ISSR-F3:801 pb	0,175	0,007	67	ISSR-F4:343 pb	0,265	0,510
25	ISSR-F3:762 pb	0,305	0,002	68	ISSR-F4:325 pb	1,428	0,003
26	ISSR-F3:715 pb	0,146	0,071	69	ISSR-F4:314 pb	0,188	0,320
27	ISSR-F3:694 pb	0,417	0,025	70	ISSR-F4:285 pb	0,041	0,448
28	ISSR-F3:645 pb	0,005	0,053	71	ISSR-F4:274 pb	0,001	0,128
29	ISSR-F3:591 pb	0,119	0,307	72	ISSR-F4:264 pb	0,035	0,862
30	ISSR-F3:570 pb	0,047	0,104	73	ISSR-F4:232 pb	0,300	1,173
31	ISSR-F3:479 pb	1,795	0,225	74	ISSR-F4:213 pb	0,293	1,386
32	ISSR-F3:694 pb	0,417	0,025	75	ISSR-F4:197 pb	0,000	0,377
33	ISSR-F3:645 pb	0,005	0,053	76	ISSR-FL1:808 pb	0,300	1,173
34	ISSR-F3:591 pb	0,119	0,307	77	ISSR-FL1:771 pb	0,034	0,479
35	ISSR-F3:570 pb	0,047	0,104	78	ISSR-FL1:737 pb	0,004	0,006
36	ISSR-F3:479 pb	1,795	0,225	79	ISSR-FL1:704 pb	0,300	1,173
37	ISSR-F3:445 pb	0,154	0,002	80	ISSR-FL1:644 pb	0,303	0,317
38	ISSR-F3:403 pb	0,111	0,000	81	ISSR-FL1:600 pb	0,299	1,092
39	ISSR-F3:386 pb	0,150	0,053	82	ISSR-FL1:582 pb	0,034	0,633
40	ISSR-F3:353 pb	0,094	0,221	83	ISSR-FL1:573 pb	0,441	0,000
41	ISSR-F3:333 pb	0,048	0,093	84	ISSR-FL1:564 pb	0,484	0,020
42	ISSR-F3:314 pb	0,109	0,220	85	ISSR-FL1:478 pb	0,995	0,325
43	ISSR-F3:294 pb	0,001	0,362	86	ISSR-FL1:465 pb	0,303	0,317

Annexe II. 4 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. albus*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
87	ISSR-FL1:456 pb	0,370	0,000	130	ISSR-FL3:629 pb	0,090	0,476
88	ISSR-FL1:446 pb	0,048	0,506	131	ISSR-FL3:590 pb	0,035	0,036
89	ISSR-FL1:428 pb	0,026	0,045	132	ISSR-FL3:571 pb	0,017	0,025
90	ISSR-FL1:405 pb	0,123	0,901	133	ISSR-FL3:550 pb	0,252	0,220
91	ISSR-FL1:381 pb	0,200	0,342	134	ISSR-FL3:520 pb	0,023	1,357
92	ISSR-FL1:365 pb	0,108	0,074	135	ISSR-FL3:500 pb	0,008	0,185
93	ISSR-FL1:345 pb	0,195	0,564	136	ISSR-FL3:476 pb	0,272	0,533
94	ISSR-FL1:309 pb	0,033	1,040	137	ISSR-FL3:445 pb	0,009	0,297
95	ISSR-FL1:286 pb	0,231	0,014	138	ISSR-FL3:426 pb	0,000	0,073
96	ISSR-FL1:280 pb	0,169	0,870	139	ISSR-FL3:404 pb	0,018	0,133
97	ISSR-FL1:271 pb	0,077	0,001	140	ISSR-FL3:384 pb	0,000	0,008
98	ISSR-FL1:263 pb	0,188	0,320	141	ISSR-FL3:370 pb	0,051	0,126
99	ISSR-FL1:255 pb	0,484	0,020	142	ISSR-FL3:349 pb	0,063	0,145
100	ISSR-FL1:248 pb	0,441	0,000	143	ISSR-FL3:349 pb	0,278	0,024
101	ISSR-FL1:229 pb	0,441	0,000	144	ISSR-FL3:344 pb	0,053	0,001
102	ISSR-FL1:205 pb	0,557	0,433	145	ISSR-FL3:333 pb	0,004	0,001
103	ISSR-FL1:186 pb	0,484	0,020	146	ISSR-FL3:313 pb	0,130	0,137
104	ISSR-FL1:164 pb	0,441	0,000	147	ISSR-FL3:286 pb	0,027	0,275
105	ISSR-FL1:142 pb	0,088	1,373	148	ISSR-FL3:269 pb	0,063	0,117
106	ISSR-FL1:127 pb	0,006	0,129	149	ISSR-FL3:263 pb	0,001	0,052
107	ISSR-FL1:114 pb	0,401	0,032	150	ISSR-FL3:241 pb	0,008	0,117
108	ISSR-FL2:414 pb	0,401	0,032	151	ISSR-FL3:228 pb	0,081	0,043
109	ISSR-FL2:391 pb	0,484	0,020	152	ISSR-FL3:213 pb	0,040	0,019
110	ISSR-FL2:362 pb	0,109	0,220	153	ISSR-FL3:198 pb	0,358	0,695
111	ISSR-FL2:322 pb	0,401	0,032	154	ISSR-FL3:182 pb	0,082	0,531
112	ISSR-FL2:306 pb	0,039	0,030	155	ISSR-FL3:165 pb	0,038	0,470
113	ISSR-FL2:285 pb	0,001	0,014	156	ISSR-FL3:152 pb	0,119	0,307
114	ISSR-FL2:255 pb	0,171	0,016	157	ISSR-FL3:139 pb	0,484	0,020
115	ISSR-FL2:220 pb	1,022	0,245	158	ISSR-FL3:129 pb	0,441	0,000
116	ISSR-FL2:207 pb	0,018	0,498	159	ISSR-FL4:801 pb	0,441	0,000
117	ISSR-FL2:176 pb	0,367	0,058	160	ISSR-FL4:769 pb	0,123	0,901
118	ISSR-FL2:143 pb	0,013	0,000	161	ISSR-FL4:716 pb	0,833	0,515
119	ISSR-FL2:138 pb	0,020	0,019	162	ISSR-FL4:653 pb	0,123	0,901
120	ISSR-FL2:133 pb	0,048	0,506	163	ISSR-FL4:617 pb	0,000	0,864
121	ISSR-FL2:123 pb	0,000	0,377	164	ISSR-FL4:612 pb	0,080	0,246
122	ISSR-FL2:109 pb	0,795	0,056	165	ISSR-FL4:548 pb	0,188	0,320
123	ISSR-FL2:104 pb	0,278	0,024	166	ISSR-FL4:500 pb	0,056	1,413
124	ISSR-FL2:96 pb	0,147	0,093	167	ISSR-FL4:467 pb	0,057	0,238
125	ISSR-FL3:1063 pb	0,401	0,032	168	ISSR-FL4:453 pb	0,048	0,506
126	ISSR-FL3:901 pb	0,028	0,000	169	ISSR-FL4:408 pb	0,338	0,145
127	ISSR-FL3:846 pb	0,245	0,235	170	ISSR-FL4:386 pb	0,188	0,320
128	ISSR-FL3:776 pb	0,252	0,220	171	ISSR-FL4:363 pb	0,069	0,494
129	ISSR-FL3:688 pb	0,005	0,053	172	ISSR-FL4:348 pb	0,080	0,246

Annexe II. 4 (suite): Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. albus*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
173	ISSR-FL4:323 pb	0,190	0,643	216	ISSR-FL7:867 pb	0,245	0,235
174	ISSR-FL4:303 pb	0,335	0,021	217	ISSR-FL7:675 pb	0,145	0,060
175	ISSR-FL4:280 pb	0,318	0,252	218	ISSR-FL7:568 pb	0,252	0,220
176	ISSR-FL4:266 pb	0,061	0,002	219	ISSR-FL7:509 pb	0,170	0,010
177	ISSR-FL4:251 pb	0,023	0,104	220	ISSR-FL7:489 pb	0,318	0,252
178	ISSR-FL4:219 pb	0,000	0,332	221	ISSR-FL7:467 pb	0,484	0,020
179	ISSR-FL4:205 pb	0,158	0,066	222	ISSR-FL7:449 pb	1,580	0,008
180	ISSR-FL4:187 pb	0,123	0,901	223	ISSR-FL7:378 pb	0,252	0,220
181	ISSR-FL4:160 pb	0,134	0,015	224	ISSR-FL7:364 pb	0,050	0,025
182	ISSR-FL4:148 pb	0,861	0,012	225	ISSR-FL7:350 pb	0,190	0,643
183	ISSR-FL4:132 pb	0,318	0,252	226	ISSR-FL7:320 pb	0,252	0,220
184	ISSR-FL4:119 pb	0,090	0,206	227	ISSR-FL7:262 pb	0,608	0,000
185	ISSR-FL4:112 pb	0,245	0,235	228	ISSR-FL7:255 pb	0,022	0,215
186	ISSR-FL5:746 pb	1,795	0,225	229	ISSR-FL7:220 pb	0,038	0,470
187	ISSR-FL5:346 pb	0,338	0,145	230	ISSR-FL7:193 pb	0,023	1,357
188	ISSR-FL5:333 pb	0,861	0,012	231	ISSR-FL7:193 pb	0,309	0,262
189	ISSR-FL5:316 pb	0,318	0,252	232	ISSR-FL7:134 pb	1,306	0,022
190	ISSR-FL5:259 pb	0,170	0,007	233	ISSR-FL7:129 pb	0,109	0,220
191	ISSR-FL5:245 pb	0,557	0,433	234	ISSR-FL8:1443 pb	0,532	0,052
192	ISSR-FL5:207 pb	0,228	0,196	235	ISSR-FL8:1221 pb	0,000	0,893
193	ISSR-FL6:908 pb	0,069	0,494	236	ISSR-FL8:1191 pb	0,059	0,157
194	ISSR-FL6:901 pb	0,082	0,531	237	ISSR-FL8:1128 pb	0,000	1,730
195	ISSR-FL6:830 pb	0,060	0,429	238	ISSR-FL8:987 pb	0,150	0,053
196	ISSR-FL6:789 pb	0,010	0,141	239	ISSR-FL8:867 pb	0,098	0,141
197	ISSR-FL6:749 pb	0,017	0,800	240	ISSR-FL8:831 pb	0,401	0,032
198	ISSR-FL6:692 pb	0,169	0,870	241	ISSR-FL8:822 pb	0,044	0,231
199	ISSR-FL6:685 pb	0,018	0,107	242	ISSR-FL8:755 pb	0,441	0,000
200	ISSR-FL6:644 pb	0,948	0,111	243	ISSR-FL8:681 pb	0,109	0,258
201	ISSR-FL6:583 pb	0,162	0,548	244	ISSR-FL8:627 pb	0,123	0,901
202	ISSR-FL6:536 pb	0,088	1,373	245	ISSR-FL8:583 pb	1,502	0,055
203	ISSR-FL6:508 pb	0,350	0,722	246	ISSR-FL8:511 pb	0,484	0,020
204	ISSR-FL6:487 pb	0,003	0,054	247	ISSR-FL8:486 pb	0,441	0,000
205	ISSR-FL6:458 pb	0,108	0,074	248	ISSR-FL8:453 pb	0,171	0,015
206	ISSR-FL6:444 pb	1,187	0,121	249	ISSR-FL8:414 pb	0,092	0,007
207	ISSR-FL6:396 pb	1,795	0,225	250	ISSR-FL8:380 pb	0,279	0,013
208	ISSR-FL6:350 pb	1,795	0,225	251	ISSR-FL8:344 pb	0,109	0,220
209	ISSR-FL6:313 pb	0,792	0,002	252	ISSR-FL8:337 pb	1,502	0,055
210	ISSR-FL6:287 pb	0,305	0,002	253	ISSR-FL8:317 pb	0,065	0,097
211	ISSR-FL6:276 pb	0,000	0,078	254	ISSR-FL8:287 pb	0,007	0,096
212	ISSR-FL6:246 pb	0,070	1,971	255	ISSR-FL8:262 pb	0,245	0,235
213	ISSR-FL6:190 pb	0,088	1,373	256	ISSR-FL8:249 pb	0,050	0,003
214	ISSR-FL6:153 pb	0,070	1,971	257	ISSR-FL8:223 pb	0,002	0,070
215	ISSR-FL7:1230pb	0,048	0,506	258	ISSR-FL8:208 pb	0,484	0,020

Annexe II. 4 (suite): Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. albus*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
259	ISSR-FL8:199 pb	0,008	0,011	297	ISSR-FL10:232 pb	0,098	0,141
260	ISSR-FL10:1752 pb	0,123	0,901	298	ISSR-FL10:216 pb	0,004	0,976
261	ISSR-FL10:1532 pb	0,002	0,000	299	ISSR-FL10:197 pb	0,231	0,017
262	ISSR-FL10:1439 pb	0,318	0,252	300	ISSR-FL10:197 pb	0,231	0,017
263	ISSR-FL10:1362 pb	0,279	0,013	301	ISSR-FL10:185 pb	0,156	0,003
264	ISSR-FL10:1326 pb	0,279	0,013	302	ISSR-FL10:149 pb	0,231	0,014
265	ISSR-FL10:1187 pb	0,108	0,074	303	ISSR-FL11:1645 pb	0,012	0,048
266	ISSR-FL10:1035 pb	0,010	0,202	304	ISSR-FL11:1269 pb	0,018	0,039
267	ISSR-FL10:995 pb	0,058	0,015	305	ISSR-FL11:1052 pb	0,401	0,032
268	ISSR-FL10:947 pb	0,356	0,017	306	ISSR-FL11:909 pb	0,252	0,220
269	ISSR-FL10:947 pb	0,000	0,239	307	ISSR-FL11:826 pb	0,098	0,171
270	ISSR-FL10:917 pb	0,318	0,252	308	ISSR-FL11:786 pb	0,330	0,653
271	ISSR-FL10:865 pb	0,028	0,037	309	ISSR-FL11:688 pb	0,650	0,348
272	ISSR-FL10:780 pb	0,278	0,024	310	ISSR-FL11:637 pb	0,059	0,157
273	ISSR-FL10:715 pb	0,048	0,506	311	ISSR-FL11:599 pb	0,007	0,185
274	ISSR-FL10:640 pb	0,001	0,359	312	ISSR-FL11:555 pb	0,709	0,953
275	ISSR-FL10:605 pb	0,002	0,605	313	ISSR-FL11:503 pb	0,082	0,531
276	ISSR-FL10:578 pb	0,088	1,373	314	ISSR-FL11:474 pb	0,003	0,356
277	ISSR-FL10:554 pb	0,006	0,129	315	ISSR-FL11:444 pb	0,008	0,117
278	ISSR-FL10:530 pb	0,401	0,032	316	ISSR-FL11:417 pb	0,484	0,020
279	ISSR-FL10:513 pb	0,074	0,734	317	ISSR-FL11:395 pb	0,016	0,009
280	ISSR-FL10:484 pb	0,003	0,002	318	ISSR-FL11:381 pb	0,011	0,024
281	ISSR-FL10:459 pb	0,028	0,037	319	ISSR-FL11:357 pb	0,072	0,297
282	ISSR-FL10:453 pb	0,098	0,139	320	ISSR-FL11:336 pb	0,003	0,173
283	ISSR-FL10:427 pb	0,486	0,308	321	ISSR-FL11:317 pb	0,134	0,012
284	ISSR-FL10:406 pb	0,027	0,275	322	ISSR-FL11:297 pb	0,028	0,002
285	ISSR-FL10:390 pb	0,129	0,167	323	ISSR-FL11:278 pb	0,033	0,428
286	ISSR-FL10:367 pb	0,023	0,023	324	ISSR-FL11:265 pb	0,219	0,038
287	ISSR-FL10:351 pb	0,202	0,069	325	ISSR-FL11:248 pb	0,033	0,428
288	ISSR-FL10:341 pb	0,108	0,074	326	ISSR-FL11:235 pb	0,019	0,011
289	ISSR-FL10:328 pb	0,531	0,076	327	ISSR-FL11:223 pb	0,197	0,053
290	ISSR-FL10:307 pb	0,003	0,081	328	ISSR-FL11:204 pb	0,033	0,428
291	ISSR-FL10:294 pb	0,689	0,098	329	ISSR-FL11:185 pb	0,011	0,223
292	ISSR-FL10:279 pb	0,340	0,102	330	ISSR-FL11:168 pb	0,123	0,901
293	ISSR-FL10:266 pb	0,248	0,571	331	ISSR-FL11:147 pb	0,335	0,021
294	ISSR-FL10:251 pb	0,017	0,155	332	ISSR-FL11:123 pb	0,484	0,020
295	ISSR-FL10:240 pb	1,428	0,003				
296	ISSR-FL10:166 pb	0,391	0,301				

Annexe II. 5. Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. cosentinii*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
1	ISSR-F1:975 bp	-1,369	-0,499	42	ISSR-FL4:437 pb	-1,369	-0,499
2	ISSR-F1:544 bp	-1,369	-0,499	43	ISSR-FL5:561 pb	-1,232	-0,281
3	ISSR-F1:329 bp	-1,232	-0,281	44	ISSR-FL5:310 pb	-0,511	-0,194
4	ISSR-F1:192 bp	1,620	2,192	45	ISSR-FL5:219 pb	-0,322	2,351
5	ISSR-F1:172 bp	-1,369	-0,499	46	ISSR-FL5:182 pb	-0,799	0,914
6	ISSR-F1:138 bp	-1,369	-0,499	47	ISSR-FL5:141 pb	-0,712	0,016
7	ISSR-F2:237 bp	1,159	-1,462	48	ISSR-FL5:343 pb	-1,232	-0,281
8	ISSR-F2:196 bp	-0,083	-1,173	49	ISSR-FL5:183 pb	-0,892	0,938
9	ISSR-F2:121 bp	0,595	-0,701	50	ISSR-FL5:116 pb	-0,263	-1,006
10	ISSR-F2:384 bp	-1,369	-0,499	51	ISSR-FL5:323 pb	-0,263	-1,006
11	ISSR-F2:395 bp	-0,098	1,671	52	ISSR-FL5:475 pb	0,240	0,235
12	ISSR-F2:146 bp	-0,799	0,914	53	ISSR-FL5:800 pb	-0,083	-1,173
13	ISSR-F3:1111 bp	-0,143	1,429	54	ISSR-FL6:896 pb	-1,232	-0,281
14	ISSR-F3:165 bp	-1,232	-0,281	55	ISSR-FL6:812 pb	2,947	-1,650
15	ISSR-F4:2164 pb	1,279	0,973	56	ISSR-FL6:723 pb	-0,127	-0,788
16	ISSR-F4:1727 pb	0,214	0,431	57	ISSR-FL6:631 pb	-1,232	-0,281
17	ISSR-F4:1477 pb	-0,263	-1,006	58	ISSR-FL4:380 pb	1,662	-0,221
18	ISSR-F4:1354 pb	-1,369	-0,499	59	ISSR-FL4:361 pb	1,679	-1,165
19	ISSR-F4:1264 pb	-0,143	1,429	60	ISSR-FL7:1826 pb	-0,712	0,016
20	ISSR-F4:203 pb	-1,369	-0,499	61	ISSR-FL7:1357 pb	-0,892	0,938
21	ISSR-F4:179 pb	-1,369	-0,499	62	ISSR-FL7:1181 pb	-0,186	2,569
22	ISSR-F4:174 pb	-0,712	0,016	63	ISSR-FL7:994 pb	2,154	-2,383
23	ISSR-FL1:1482 pb	0,214	0,431	64	ISSR-FL7:827 pb	3,669	-1,563
24	ISSR-FL1:1325 pb	-0,712	0,016	65	ISSR-FL7:466 pb	1,662	-0,221
25	ISSR-FL1:1123 pb	-1,232	-0,281	66	ISSR-FL7:439 pb	-0,322	2,351
26	ISSR-FL1:1067 pb	0,443	0,625	67	ISSR-FL7:436 pb	2,291	-2,165
27	ISSR-FL1:1060 pb	-1,369	-0,499	68	ISSR-FL7:387 pb	-1,369	-0,499
28	ISSR-FL1:852 pb	-1,369	-0,499	69	ISSR-FL7:273 pb	1,159	-1,462
29	ISSR-FL1:805 pb	-1,369	-0,499	70	ISSR-FL8:144 pb	-0,100	-0,984
30	ISSR-FL1:585 pb	-1,369	-0,499	71	ISSR-FL7:108 pb	-0,712	0,016
31	ISSR-FL1:168 pb	-1,369	-0,499	72	ISSR-FL8:941 pb	2,291	-2,165
32	ISSR-FL1:566 pb	-0,712	0,016	73	ISSR-FL8:710 pb	0,394	0,264
33	ISSR-FL1:474 pb	-1,369	-0,499	74	ISSR-FL9:891 pb	-0,892	0,938
34	ISSR-FL1:375 pb	-1,369	-0,499	75	ISSR-FL9:670 pb	1,525	-1,194
35	ISSR-FL2:397 pb	-1,369	-0,499	76	ISSR-FL9:622 pb	2,723	-0,970
36	ISSR-FL2:111 pb	-1,369	-0,499	77	ISSR-FL9:478 pb	-1,232	-0,281
37	ISSR-FL3:1773 pb	-0,892	0,938	78	ISSR-FL9:100 pb	3,380	-0,455
38	ISSR-FL3:1332 pb	-0,712	0,016	79	ISSR-FL10:1183 pb	-0,263	-1,006
39	ISSR-FL3:125 pb	-1,369	-0,499	80	ISSR-FL10:1057 pb	-0,322	2,351
40	ISSR-FL4:640 pb	-0,511	-0,194	81	ISSR-FL10:932 pb	-0,755	1,156
41	ISSR-FL4:561 pb	-1,232	-0,281	82	ISSR-FL11:154 pb	2,947	-1,650

Annexe II. 5 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. cosentinii*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
83	ISSR-FL11:136 pb	2,154	-2,383	124	ISSR-F2:318 pb	-1,232	-0,281
84	ISSR-F1:883 pb	0,471	3,084	125	ISSR-F2:822 pb	2,723	-0,970
85	ISSR-F1:819 pb	0,146	0,321	126	ISSR-F2:365 pb	1,865	1,469
86	ISSR-F1:749 pb	-0,374	0,024	127	ISSR-F2:334 pb	-1,369	-0,499
87	ISSR-F1:650 pb	4,715	1,287	128	ISSR-F2:292 pb	-0,186	2,569
88	ISSR-F1:632 pb	-0,374	0,024	129	ISSR-F2:460 pb	3,012	-2,078
89	ISSR-F1:614 pb	0,214	0,431	130	ISSR-F2:274 pb	-0,511	-0,194
90	ISSR-F1:581 pb	-0,237	-1,202	131	ISSR-F2:258 pb	-0,322	2,351
91	ISSR-F1:558 pb	-0,755	1,156	132	ISSR-F2:637 pb	-0,511	-0,194
92	ISSR-F1:517 pb	0,306	0,407	133	ISSR-F2:543 pb	2,154	-2,383
93	ISSR-F1:488 pb	1,192	3,171	134	ISSR-F2:497 pb	-1,232	-0,281
94	ISSR-F1:464 pb	-0,083	-1,173	135	ISSR-F2:416 pb	-1,369	-0,499
95	ISSR-F1:432 pb	-1,369	-0,499	136	ISSR-F2:435 pb	1,620	2,192
96	ISSR-F1:390 pb	-0,712	0,016	137	ISSR-F3:1060 pb	-0,237	-1,202
97	ISSR-F1:348 pb	-1,369	-0,499	138	ISSR-F3:927 pb	-1,369	-0,499
98	ISSR-F1:334 pb	-1,369	-0,499	139	ISSR-F3:822 pb	-0,322	2,351
99	ISSR-F1:301 pb	-0,511	-0,194	140	ISSR-F3:751 pb	-1,369	-0,499
100	ISSR-F1:283 pb	-1,369	-0,499	141	ISSR-F3:685 pb	-1,369	-0,499
101	ISSR-F1:283 pb	-1,369	-0,499	142	ISSR-F3:623 pb	-1,369	-0,499
102	ISSR-F1:270 pb	3,200	0,467	143	ISSR-F3:585 pb	-1,232	-0,281
103	ISSR-F1:245 pb	-0,127	-0,788	144	ISSR-F3:553 pb	-1,369	-0,499
104	ISSR-F1:228 pb	-0,263	-1,006	145	ISSR-F3:523 pb	-1,232	-0,281
105	ISSR-F1:214 pb	-0,237	-1,202	146	ISSR-F3:489 pb	-1,232	-0,281
106	ISSR-F1:200 pb	1,880	-1,375	147	ISSR-F3:467 pb	-0,374	0,024
107	ISSR-F1:181 pb	0,377	0,453	148	ISSR-F3:449 pb	-1,369	-0,499
108	ISSR-F1:155 pb	1,251	-0,186	149	ISSR-F3:422 pb	-1,369	-0,499
109	ISSR-F2:683 pb	3,610	1,794	150	ISSR-F3:402 pb	-1,232	-0,281
110	ISSR-F2:382 pb	-0,374	0,024	151	ISSR-F3:373 pb	-1,369	-0,499
111	ISSR-F2:222 pb	-1,369	-0,499	152	ISSR-F3:347 pb	1,005	-1,491
112	ISSR-F2:132 pb	0,758	-0,679	153	ISSR-F3:314 pb	-1,232	-0,281
113	ISSR-F2:115 pb	1,072	0,736	154	ISSR-F3:300 pb	-0,712	0,016
114	ISSR-F2:746 pb	-0,374	0,024	155	ISSR-F3:290 pb	-0,511	-0,194
115	ISSR-F2:736 pb	1,022	-1,680	156	ISSR-F3:277 pb	-0,755	1,156
116	ISSR-F2:594 pb	0,758	-0,679	157	ISSR-F3:258 pb	-1,232	-0,281
117	ISSR-F2:480 pb	0,536	2,656	158	ISSR-F3:244 pb	-1,369	-0,499
118	ISSR-F2:307 pb	1,022	-1,680	159	ISSR-F3:234 pb	-1,369	-0,499
119	ISSR-F2:137 pb	0,758	-0,679	160	ISSR-F3:230 pb	-1,232	-0,281
120	ISSR-F2:774 pb	4,195	0,990	161	ISSR-F3:221 pb	-1,369	-0,499
121	ISSR-F2:571 pb	-0,143	1,429	162	ISSR-F3:205 pb	4,282	0,092
122	ISSR-F2:522 pb	0,869	-1,709	163	ISSR-F3:194 pb	-0,006	1,647
123	ISSR-F2:350 pb	0,536	2,656	164	ISSR-F3:184 pb	-1,369	-0,499

Annexe II. 5 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. cosentinii*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
165	ISSR-F3:175 pb	1,525	-1,194	206	ISSR-FL1:724 pb	-0,663	1,132
166	ISSR-FL7:1550 pb	-0,799	0,914	207	ISSR-FL1:697 pb	-1,369	-0,499
167	ISSR-FL7:931 pb	0,623	1,758	208	ISSR-FL1:685 pb	0,715	1,733
168	ISSR-FL7:883 pb	-1,232	-0,281	209	ISSR-FL1:655 pb	-1,369	-0,499
169	ISSR-F4:843 pb	-1,369	-0,499	210	ISSR-FL1:625 pb	-0,263	-1,006
170	ISSR-F4:816 pb	-1,369	-0,499	211	ISSR-FL1:597 pb	-1,232	-0,281
171	ISSR-F4:776 pb	-0,100	-0,984	212	ISSR-FL1:574 pb	0,595	-0,701
172	ISSR-F4:732 pb	0,443	0,625	213	ISSR-FL1:531 pb	-0,663	1,132
173	ISSR-F4:700 pb	0,623	1,758	214	ISSR-FL1:495 pb	0,573	-0,658
174	ISSR-F4:657 pb	-0,100	-0,984	215	ISSR-FL1:459 pb	4,058	0,772
175	ISSR-F4:619 pb	-0,263	-1,006	216	ISSR-FL1:440 pb	-1,369	-0,499
176	ISSR-F4:584 pb	0,471	3,084	217	ISSR-FL1:423 pb	1,033	0,968
177	ISSR-F4:566 pb	-1,369	-0,499	218	ISSR-FL1:392 pb	-0,511	-0,194
178	ISSR-F4:546 pb	-1,232	-0,281	219	ISSR-FL1:358 pb	2,182	0,076
179	ISSR-F4:522 pb	-1,369	-0,499	220	ISSR-FL1:333 pb	-1,369	-0,499
180	ISSR-F4:497 pb	-0,237	-1,202	221	ISSR-FL1:311 pb	0,595	-0,701
181	ISSR-F4:472 pb	-0,799	0,914	222	ISSR-FL1:296 pb	0,394	0,264
182	ISSR-F4:458 pb	0,306	0,407	223	ISSR-FL1:280 pb	1,251	-0,186
183	ISSR-F4:437 pb	-0,034	1,243	224	ISSR-FL1:269 pb	0,783	1,844
184	ISSR-F4:421 pb	0,283	0,539	225	ISSR-FL1:257 pb	0,053	-0,955
185	ISSR-F4:406 pb	-1,369	-0,499	226	ISSR-FL1:244 pb	0,420	-0,687
186	ISSR-F4:391 pb	-0,892	0,938	227	ISSR-FL1:232 pb	1,641	2,149
187	ISSR-F4:385 pb	-0,712	0,016	228	ISSR-FL1:215 pb	-0,143	1,429
188	ISSR-F4:364 pb	-0,237	-1,202	229	ISSR-FL1:203 pb	-0,892	0,938
189	ISSR-F4:344 pb	0,486	0,240	230	ISSR-FL1:195 pb	0,059	1,219
190	ISSR-F4:329 pb	1,729	1,251	231	ISSR-FL1:192 pb	-1,369	-0,499
191	ISSR-F4:320 pb	-1,369	-0,499	232	ISSR-FL1:184 pb	-1,369	-0,499
192	ISSR-F4:302 pb	-1,369	-0,499	233	ISSR-FL1:178 pb	-1,369	-0,499
193	ISSR-F4:290 pb	-1,369	-0,499	234	ISSR-FL1:161 pb	-1,369	-0,499
194	ISSR-F4:277 pb	-1,369	-0,499	235	ISSR-FL1:156 pb	-0,755	1,156
195	ISSR-F4:263 pb	-1,232	-0,281	236	ISSR-FL1:149 pb	-1,369	-0,499
196	ISSR-F4:248 pb	-0,263	-1,006	237	ISSR-FL1:135 pb	-1,232	-0,281
197	ISSR-F4:237 pb	-0,127	-0,788	238	ISSR-FL1:126 pb	-1,369	-0,499
198	ISSR-F4:224 pb	0,595	-0,701	239	ISSR-FL1:116 pb	-0,237	-1,202
199	ISSR-F4:214 pb	-1,232	-0,281	240	ISSR-FL2:1696 pb	1,159	-1,462
200	ISSR-F4:193 pb	-1,369	-0,499	241	ISSR-FL2:1299 pb	-0,511	-0,194
201	ISSR-FL1:1199 pb	-0,127	-0,788	242	ISSR-FL2:1241 pb	-0,322	2,351
202	ISSR-FL1:976 pb	-1,369	-0,499	243	ISSR-FL2:1173 pb	1,022	-1,680
203	ISSR-FL1:908 pb	0,306	0,407	244	ISSR-FL2:1093 pb	1,049	-1,876
204	ISSR-FL1:772 pb	-0,127	-0,788	245	ISSR-FL2:924 pb	-1,369	-0,499
205	ISSR-FL1:744 pb	-1,369	-0,499	246	ISSR-FL2:848 pb	0,443	0,625

Annexe II. 5 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. cosentinii*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
247	ISSR-FL2:780 pb	-0,575	0,234	288	ISSR-FL3:586 pb	-0,322	2,351
248	ISSR-FL2:727 pb	0,283	0,539	289	ISSR-FL3:568 pb	-0,511	-0,194
249	ISSR-FL2:676 pb	-0,892	0,938	290	ISSR-FL3:552 pb	2,069	1,170
250	ISSR-FL2:628 pb	-1,369	-0,499	291	ISSR-FL3:535 pb	-0,575	0,234
251	ISSR-FL2:588 pb	-1,369	-0,499	292	ISSR-FL3:510 pb	-0,511	-0,194
252	ISSR-FL2:544 pb	-0,263	-1,006	293	ISSR-FL3:491 pb	0,393	-0,491
253	ISSR-FL2:521 pb	1,577	2,577	294	ISSR-FL3:467 pb	-0,083	-1,173
254	ISSR-FL2:490 pb	-0,083	-1,173	295	ISSR-FL3:450 pb	0,621	-0,897
255	ISSR-FL2:459 pb	1,641	2,149	296	ISSR-FL3:431 pb	-1,369	-0,499
256	ISSR-FL2:442 pb	-0,237	-1,202	297	ISSR-FL3:412 pb	-0,237	-1,202
257	ISSR-FL2:415 pb	-0,712	0,016	298	ISSR-FL3:387 pb	-0,263	-1,006
258	ISSR-FL2:377 pb	-0,034	1,243	299	ISSR-FL3:366 pb	1,185	-1,658
259	ISSR-FL2:367 pb	1,005	-1,491	300	ISSR-FL3:342 pb	-1,369	-0,499
260	ISSR-FL2:354 pb	-0,083	-1,173	301	ISSR-FL3:330 pb	-1,369	-0,499
261	ISSR-FL2:338 pb	-0,755	1,156	302	ISSR-FL3:326 pb	-1,369	-0,499
262	ISSR-FL2:314 pb	-0,712	0,016	303	ISSR-FL3:314 pb	-0,237	-1,202
263	ISSR-FL2:298 pb	-0,263	-1,006	304	ISSR-FL3:294 pb	-1,369	-0,499
264	ISSR-FL2:284 pb	-0,237	-1,202	305	ISSR-FL3:280 pb	-1,369	-0,499
265	ISSR-FL2:269 pb	3,151	0,795	306	ISSR-FL3:269 pb	1,049	-1,876
266	ISSR-FL2:251 pb	-1,369	-0,499	307	ISSR-FL3:262 pb	-0,083	-1,173
267	ISSR-FL2:233 pb	1,778	2,367	308	ISSR-FL3:250 pb	-1,369	-0,499
268	ISSR-FL2:224 pb	0,989	0,726	309	ISSR-FL3:241 pb	-1,369	-0,499
269	ISSR-FL2:219 pb	-0,263	-1,006	310	ISSR-FL3:226 pb	-1,369	-0,499
270	ISSR-FL2:205 pb	-0,755	1,156	311	ISSR-FL3:214 pb	-0,712	0,016
271	ISSR-FL2:195 pb	0,306	0,407	312	ISSR-FL3:198 pb	-1,232	-0,281
272	ISSR-FL2:187 pb	-1,369	-0,499	313	ISSR-FL3:182 pb	1,022	-1,680
273	ISSR-FL2:179 pb	-0,263	-1,006	314	ISSR-FL3:175 pb	0,240	0,235
274	ISSR-FL2:163 pb	-1,369	-0,499	315	ISSR-FL3:163 pb	-0,892	0,938
275	ISSR-FL2:151 pb	-1,369	-0,499	316	ISSR-FL3:154 pb	-1,232	-0,281
276	ISSR-FL2:137 pb	-1,369	-0,499	317	ISSR-FL3:139 pb	0,306	0,407
277	ISSR-FL2:126 pb	-0,322	2,351	318	ISSR-FL4:461 pb	0,573	-0,658
278	ISSR-FL3:1236 pb	-1,369	-0,499	319	ISSR-FL4:396 pb	-0,098	1,671
279	ISSR-FL3:1024 pb	-0,712	0,016	320	ISSR-FL4:352 pb	-0,712	0,016
280	ISSR-FL3:957 pb	-0,511	-0,194	321	ISSR-FL4:332 pb	-1,232	-0,281
281	ISSR-FL3:896 pb	-1,369	-0,499	322	ISSR-FL4:314 pb	-0,712	0,016
282	ISSR-FL3:847 pb	-0,322	2,351	323	ISSR-FL4:293 pb	0,420	-0,687
283	ISSR-FL3:764 pb	-0,892	0,938	324	ISSR-FL4:280 pb	-0,263	-1,006
284	ISSR-FL3:737 pb	1,592	-0,267	325	ISSR-FL4:270 pb	-1,369	-0,499
285	ISSR-FL3:689 pb	0,420	-0,687	326	ISSR-FL4:250 pb	-1,232	-0,281
286	ISSR-FL3:623 pb	-0,186	2,569	327	ISSR-FL4:237 pb	-0,755	1,156
287	ISSR-FL3:597 pb	-0,511	-0,194	328	ISSR-FL4:212 pb	-0,755	1,156

Annexe II. 5 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. cosentinii*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
329	ISSR-FL4:198 pb	-1,369	-0,499	370	ISSR-FL6:496 pb	0,146	0,321
330	ISSR-FL4:180 pb	1,636	-0,025	371	ISSR-FL6:440 pb	-0,322	2,351
331	ISSR-FL4:164 pb	-0,799	0,914	372	ISSR-FL6:412 pb	-0,712	0,016
332	ISSR-FL4:163 pb	0,623	0,458	373	ISSR-FL6:384 pb	-1,369	-0,499
333	ISSR-FL4:146 pb	0,852	1,951	374	ISSR-FL6:365 pb	-0,511	-0,194
334	ISSR-FL4:134 pb	-0,892	0,938	375	ISSR-FL6:355 pb	-1,232	-0,281
335	ISSR-FL4:123 pb	-0,235	1,453	376	ISSR-FL6:334 pb	-1,369	-0,499
336	ISSR-FL4:114 pb	1,190	0,516	377	ISSR-FL6:317 pb	-1,369	-0,499
337	ISSR-FL4:100 pb	1,821	1,226	378	ISSR-FL6:299 pb	-0,511	-0,194
338	ISSR-FL5:684 pb	2,773	1,446	379	ISSR-FL6:288 pb	-0,374	0,024
339	ISSR-FL5:625 pb	3,063	1,693	380	ISSR-FL6:281 pb	-1,369	-0,499
340	ISSR-FL5:515 pb	-1,369	-0,499	381	ISSR-FL6:264 pb	-1,369	-0,499
341	ISSR-FL5:452 pb	-1,369	-0,499	382	ISSR-FL6:251 pb	-0,511	-0,194
342	ISSR-FL5:252 pb	-0,237	-1,202	383	ISSR-FL6:237 pb	-1,369	-0,499
343	ISSR-FL5:148 pb	-1,369	-0,499	384	ISSR-FL6:233 pb	0,621	-0,897
344	ISSR-FL5:502 pb	-1,369	-0,499	385	ISSR-FL6:217 pb	0,536	2,656
345	ISSR-FL5:386 pb	-1,232	-0,281	386	ISSR-FL6:209 pb	2,154	-2,383
346	ISSR-FL5:291 pb	0,573	-0,658	387	ISSR-FL6:192 pb	-0,892	0,938
347	ISSR-FL5:245 pb	-0,083	-1,173	388	ISSR-FL6:179 pb	1,414	-0,164
348	ISSR-FL5:132 pb	-0,083	-1,173	389	ISSR-FL6:163 pb	-0,799	0,914
349	ISSR-FL5:696 pb	-0,083	-1,173	390	ISSR-FL6:153 pb	1,049	-1,876
350	ISSR-FL5:273 pb	-0,098	1,671	391	ISSR-FL6:148 pb	-0,083	-1,173
351	ISSR-FL5:257 pb	-1,369	-0,499	392	ISSR-FL6:138 pb	-0,511	-0,194
352	ISSR-FL5:207 pb	1,049	-1,876	393	ISSR-FL6:132 pb	-0,712	0,016
353	ISSR-FL5:171 pb	-0,511	-0,194	394	ISSR-FL6:120 pb	0,810	1,648
354	ISSR-FL5:424 pb	0,351	0,649	395	ISSR-FL6:116 pb	0,573	-0,658
355	ISSR-FL5:353 pb	-0,083	-1,173	396	ISSR-FL6:110 pb	-0,755	1,156
356	ISSR-FL5:163 pb	1,346	-0,272	397	ISSR-FL7:780 pb	-0,511	-0,194
357	ISSR-FL5:652 pb	2,001	1,059	398	ISSR-FL7:729 pb	2,631	-0,946
358	ISSR-FL5:538 pb	2,752	1,489	399	ISSR-FL7:675 pb	0,393	-0,491
359	ISSR-FL5:442 pb	-0,374	0,024	400	ISSR-FL7:602 pb	0,334	2,866
360	ISSR-FL5:200 pb	0,573	-0,658	401	ISSR-FL7:554 pb	-0,712	0,016
361	ISSR-FL5:194 pb	1,466	2,163	402	ISSR-FL7:531 pb	-0,712	0,016
362	ISSR-FL5:400 pb	0,672	2,874	403	ISSR-FL7:490 pb	0,486	0,240
363	ISSR-FL5:231 pb	1,847	1,031	404	ISSR-FL7:414 pb	-1,232	-0,281
364	ISSR-FL5:157 pb	-0,186	2,569	405	ISSR-FL7:373 pb	0,334	2,866
365	ISSR-FL5:126 pb	2,154	-2,383	406	ISSR-FL7:354 pb	-0,083	-1,173
366	ISSR-FL5:283 pb	0,469	0,429	407	ISSR-FL7:341 pb	-0,712	0,016
367	ISSR-FL6:579 pb	1,499	-0,243	408	ISSR-FL7:322 pb	0,053	-0,955
368	ISSR-FL6:548 pb	1,049	-1,876	409	ISSR-FL7:308 pb	-0,263	-1,006
369	ISSR-FL6:518 pb	-0,186	2,569	410	ISSR-FL7:300 pb	-0,263	-1,006

Annexe II. 5 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. cosentinii*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
411	ISSR-FL7:285 pb	1,620	2,192	452	ISSR-FL8:164 pb	3,805	-1,345
412	ISSR-FL7:276 pb	1,022	-1,680	453	ISSR-FL8:153 pb	-1,232	-0,281
413	ISSR-FL7:258 pb	-1,369	-0,499	454	ISSR-FL9:1095 pb	-0,892	0,938
414	ISSR-FL7:237 pb	-0,263	-1,006	455	ISSR-FL9:819 pb	2,248	0,248
415	ISSR-FL7:228 pb	-1,232	-0,281	456	ISSR-FL9:752 pb	1,438	-0,296
416	ISSR-FL7:223 pb	-0,127	-0,788	457	ISSR-FL9:728 pb	-1,369	-0,499
417	ISSR-FL7:203 pb	-1,369	-0,499	458	ISSR-FL9:587 pb	-1,232	-0,281
418	ISSR-FL7:180 pb	-0,799	0,914	459	ISSR-FL9:541 pb	-0,322	2,351
419	ISSR-FL7:169 pb	2,154	-2,383	460	ISSR-FL9:459 pb	-1,369	-0,499
420	ISSR-FL7:163 pb	-0,663	1,132	461	ISSR-FL9:430 pb	-0,006	1,647
421	ISSR-FL7:149 pb	-0,712	0,016	462	ISSR-FL9:409 pb	-1,369	-0,499
422	ISSR-FL7:135 pb	-0,663	1,132	463	ISSR-FL9:392 pb	0,672	2,874
423	ISSR-FL7:127 pb	-0,263	-1,006	464	ISSR-FL9:370 pb	0,573	-0,658
424	ISSR-FL7:116 pb	0,195	1,437	465	ISSR-FL9:359 pb	1,641	2,149
425	ISSR-FL8:1228 pb	-0,712	0,016	466	ISSR-FL9:346 pb	1,525	-1,194
426	ISSR-FL8:793 pb	3,669	-1,563	467	ISSR-FL9:329 pb	0,911	-0,650
427	ISSR-FL8:681 pb	-1,232	-0,281	468	ISSR-FL9:314 pb	-0,322	2,351
428	ISSR-FL8:624 pb	1,049	-1,876	469	ISSR-FL9:299 pb	2,520	-0,671
429	ISSR-FL8:576 pb	-0,127	-0,788	470	ISSR-FL9:275 pb	-0,322	2,351
430	ISSR-FL8:529 pb	2,614	2,715	471	ISSR-FL9:255 pb	-0,712	0,016
431	ISSR-FL8:511 pb	2,154	-2,383	472	ISSR-FL9:243 pb	3,149	-1,860
432	ISSR-FL8:488 pb	0,963	0,922	473	ISSR-FL9:229 pb	-1,369	-0,499
433	ISSR-FL8:479 pb	2,494	0,280	474	ISSR-FL9:213 pb	2,520	0,084
434	ISSR-FL8:456 pb	3,517	-0,237	475	ISSR-FL9:200 pb	-0,263	-1,006
435	ISSR-FL8:429 pb	1,778	2,367	476	ISSR-FL9:188 pb	0,715	1,733
436	ISSR-FL8:416 pb	1,022	-1,680	477	ISSR-FL9:179 pb	1,499	-0,243
437	ISSR-FL8:390 pb	-0,663	1,132	478	ISSR-FL9:170 pb	0,059	1,219
438	ISSR-FL8:363 pb	-1,369	-0,499	479	ISSR-FL9:154 pb	1,033	0,968
439	ISSR-FL8:351 pb	-0,006	1,647	480	ISSR-FL9:141 pb	1,880	-1,375
440	ISSR-FL8:328 pb	-0,237	-1,202	481	ISSR-FL9:132 pb	0,469	0,429
441	ISSR-FL8:299 pb	2,069	1,170	482	ISSR-FL9:124 pb	0,775	-0,868
442	ISSR-FL8:277 pb	2,563	-1,056	483	ISSR-FL9:115 pb	-0,712	0,016
443	ISSR-FL8:260 pb	1,159	-1,462	484	ISSR-FL9:107 pb	-1,369	-0,499
444	ISSR-FL8:241 pb	0,240	0,235	485	ISSR-FL10:821 pb	-0,712	0,016
445	ISSR-FL8:230 pb	1,592	-0,267	486	ISSR-FL10:762 pb	-1,369	-0,499
446	ISSR-FL8:219 pb	0,623	1,758	487	ISSR-FL10:692 pb	-0,799	0,914
447	ISSR-FL8:208 pb	-1,369	-0,499	488	ISSR-FL10:677 pb	-0,235	1,453
448	ISSR-FL8:194 pb	-0,575	0,234	489	ISSR-FL10:644 pb	-0,755	1,156
449	ISSR-FL8:185 pb	-0,237	-1,202	490	ISSR-FL10:604 pb	-0,034	1,243
450	ISSR-FL8:180 pb	0,394	0,264	491	ISSR-FL10:590 pb	1,592	-0,267
451	ISSR-FL8:173 pb	-0,322	2,351	492	ISSR-FL10:572 pb	1,005	-1,491

Annexe II. 5 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. cosentinii*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
493	ISSR-FL10:548 pb	-0,263	-1,006	516	ISSR-FL11:598 pb	0,486	0,240
494	ISSR-FL10:507 pb	0,334	2,866	517	ISSR-FL11:570 pb	0,146	0,321
495	ISSR-FL10:481 pb	2,154	-2,383	518	ISSR-FL11:545 pb	1,880	-1,375
496	ISSR-FL10:446 pb	-0,511	-0,194	519	ISSR-FL11:501 pb	-0,237	-1,202
497	ISSR-FL10:422 pb	-0,235	1,453	520	ISSR-FL11:467 pb	-0,322	2,351
498	ISSR-FL10:404 pb	1,880	-1,375	521	ISSR-FL11:426 pb	3,669	-1,563
499	ISSR-FL10:386 pb	1,098	0,540	522	ISSR-FL11:382 pb	-0,755	1,156
500	ISSR-FL10:373 pb	0,963	0,922	523	ISSR-FL11:372 pb	1,618	-0,463
501	ISSR-FL10:356 pb	-0,083	-1,173	524	ISSR-FL11:360 pb	-0,799	0,914
502	ISSR-FL10:352 pb	0,240	0,235	525	ISSR-FL11:342 pb	1,251	-0,186
503	ISSR-FL10:341 pb	1,821	1,226	526	ISSR-FL11:327 pb	1,705	-1,361
504	ISSR-FL10:318 pb	-0,263	-1,006	527	ISSR-FL11:313 pb	-0,755	1,156
505	ISSR-FL10:304 pb	-1,232	-0,281	528	ISSR-FL11:295 pb	-0,799	0,914
506	ISSR-FL10:293 pb	-1,369	-0,499	529	ISSR-FL11:281 pb	3,669	-1,563
507	ISSR-FL10:272 pb	1,729	1,251	530	ISSR-FL11:263 pb	-1,232	-0,281
508	ISSR-FL10:260 pb	1,618	-0,463	531	ISSR-FL11:258 pb	3,583	1,990
509	ISSR-FL10:238 pb	0,334	2,866	532	ISSR-FL11:248 pb	-0,237	-1,202
510	ISSR-FL10:227 pb	3,149	-1,860	533	ISSR-FL11:230 pb	-1,232	-0,281
511	ISSR-FL10:217 pb	0,334	2,866	534	ISSR-FL11:222 pb	-0,322	2,351
512	ISSR-FL10:208 pb	0,621	-0,897	535	ISSR-FL11:211 pb	1,880	-1,375
513	ISSR-FL10:187 pb	-0,127	-0,788	536	ISSR-FL11:191 pb	1,126	0,944
514	ISSR-FL10:176 pb	2,520	0,084	537	ISSR-FL11:179 pb	-0,755	1,156
515	ISSR-FL10:151 pb	-1,369	-0,499	538	ISSR-FL11:166 pb	-0,322	2,351

Annexe II.6. Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. luteus*.

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
1	ISSR-F1:1415 pb	1,107	0,35	43	ISSR-F2:282 pb	0,489	0,402
2	ISSR-F1:1071 pb	0,499	0,026	44	ISSR-F2:265 pb	0,492	0,005
3	ISSR-F1:629 pb	0,461	0,002	45	ISSR-F2:258 pb	0,069	0,034
4	ISSR-F1:556 pb	0,004	0,284	46	ISSR-F2:242 pb	0,174	0,002
5	ISSR-F1:534 pb	0,008	0,5	47	ISSR-F2:222 pb	0,142	2,602
6	ISSR-F1:509 pb	0,526	0,186	48	ISSR-F2:207 pb	0,424	0,050
7	ISSR-F1:426 pb	0,008	0,5	49	ISSR-F2:186 pb	0,325	0,247
8	ISSR-F1:404 pb	0,553	0,042	50	ISSR-F2:166 pb	0,000	0,267
9	ISSR-F1:371 pb	0,08	0,232	51	ISSR-F2:158 pb	0,082	1,517
10	ISSR-F1:343 pb	0,004	0,284	52	ISSR-F2:146 pb	0,276	0,117
11	ISSR-F1:321 pb	0,003	0,194	53	ISSR-F2:132 pb	0,408	0,000
12	ISSR-F1:305 pb	0,051	0,108	54	ISSR-F3:1383 pb	0,091	0,066
13	ISSR-F1:293 pb	0,09	0,862	55	ISSR-F3:1289 pb	1,601	0,020
14	ISSR-F1:279 pb	0,009	0,093	56	ISSR-F3:1125 pb	0,091	0,066
15	ISSR-F1:248 pb	0,001	0,15	57	ISSR-F3:1052 pb	1,129	0,107
16	ISSR-F1:237 pb	0,059	0,206	58	ISSR-F3:979 pb	0,474	0,039
17	ISSR-F1:224 pb	0,004	0,284	59	ISSR-F3:934 pb	0,010	0,240
18	ISSR-F1:203 pb	0,091	0,066	60	ISSR-F3:889 pb	0,001	0,009
19	ISSR-F1:170 pb	0,109	0,154	61	ISSR-F3:838 pb	0,001	0,150
20	ISSR-F1:157 pb	0,408	0	62	ISSR-F3:784 pb	0,977	0,074
21	ISSR-F1:151 pb	0	0,073	63	ISSR-F3:701 pb	1,827	0,335
22	ISSR-F1:132 pb	0	0,032	64	ISSR-F3:653 pb	0,349	1,352
23	ISSR-F1:123 pb	0,008	0,5	65	ISSR-F3:590 pb	0,000	1,484
24	ISSR-F2:791 pb	0	0,267	66	ISSR-F3:569 pb	0,076	0,098
25	ISSR-F2:755 pb	0	0,945	67	ISSR-F3:552 pb	0,384	0,076
26	ISSR-F2:717 pb	0,135	0,001	68	ISSR-F3:529 pb	1,129	0,107
27	ISSR-F2:681 pb	0,362	0,058	69	ISSR-F3:497 pb	0,457	0,564
28	ISSR-F2:638 pb	0,499	0,026	70	ISSR-F3:478 pb	1,601	0,020
29	ISSR-F2:602 pb	1,134	0,14	71	ISSR-F3:451 pb	1,107	0,350
30	ISSR-F2:566 pb	0,001	0,637	72	ISSR-F3:418 pb	0,000	0,073
31	ISSR-F2:546 pb	0,004	0,284	73	ISSR-F3:383 pb	0,142	2,602
32	ISSR-F2:530 pb	0,111	0,231	74	ISSR-F3:358 pb	0,152	1,948
33	ISSR-F2:502 pb	0,109	0,598	75	ISSR-F3:328 pb	0,197	0,048
34	ISSR-F2:474 pb	0,074	1,216	76	ISSR-F3:309 pb	1,107	0,350
35	ISSR-F2:433 pb	0,79	0,001	77	ISSR-F3:286 pb	0,000	0,073
36	ISSR-F2:408 pb	0,199	0,848	78	ISSR-F3:256 pb	1,827	0,335
37	ISSR-F2:387 pb	0,039	0,253	79	ISSR-F3:230 pb	0,952	0,584
38	ISSR-F2:368 pb	0,135	0,001	80	ISSR-F3:220 pb	1,601	0,020
39	ISSR-F2:347 pb	0,1	0,126	81	ISSR-F3:209 pb	0,499	0,026
40	ISSR-F2:335 pb	0,131	0,001	82	ISSR-F3:188 pb	1,129	0,107
41	ISSR-F2:315 pb	0,001	0,637	83	ISSR-F3:164 pb	1,129	0,107
42	ISSR-F2:292 pb	0,162	0,007	84	ISSR-FL1:1384 pb	0,499	0,026

Annexe II.6 (suite). Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. luteus*

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
85	ISSR-FL1:1024 pb	0,499	0,026	127	ISSR-FL1:580 pb	0,553	0,042
86	ISSR-FL1:875 pb	0,362	0,058	128	ISSR-FL1:532 pb	1,129	0,107
87	ISSR-FL1:792 pb	0,004	0,284	129	ISSR-FL1:508 pb	0,147	0,362
88	ISSR-FL1:792 pb	0,057	0,298	130	ISSR-FL1:484 pb	0,009	0,093
89	ISSR-FL1:709 pb	0,010	0,240	131	ISSR-FL1:450 pb	1,129	0,107
90	ISSR-FL1:640 pb	1,129	0,107	132	ISSR-FL1:420 pb	1,827	0,335
91	ISSR-FL1:640 pb	0,128	0,047	133	ISSR-FL1:362 pb	0,118	0,021
92	ISSR-FL1:603 pb	0,000	0,094	134	ISSR-FL1:342 pb	0,209	0,000
93	ISSR-FL1:600 pb	0,069	0,034	135	ISSR-FL1:306 pb	0,098	1,118
94	ISSR-FL1:580 pb	0,553	0,042	136	ISSR-FL1:299 pb	0,057	0,298
95	ISSR-FL1:532 pb	1,129	0,107	137	ISSR-FL1:288 pb	0,006	0,006
96	ISSR-FL1:508 pb	0,147	0,362	138	ISSR-FL1:276 pb	0,007	0,008
97	ISSR-FL1:484 pb	0,009	0,093	139	ISSR-FL1:269 pb	0,111	0,231
98	ISSR-FL1:450 pb	1,129	0,107	140	ISSR-FL1:254 pb	0,057	0,298
99	ISSR-FL1:420 pb	1,827	0,335	141	ISSR-FL1:236 pb	0,408	0,000
100	ISSR-FL1:362 pb	0,118	0,021	142	ISSR-FL1:227 pb	0,004	0,284
101	ISSR-FL1:342 pb	0,209	0,000	143	ISSR-FL1:208 pb	0,499	0,026
102	ISSR-FL1:306 pb	0,098	1,118	144	ISSR-FL1:198 pb	0,110	0,469
103	ISSR-FL1:299 pb	0,057	0,298	145	ISSR-FL1:179 pb	0,001	0,150
104	ISSR-FL1:288 pb	0,006	0,006	146	ISSR-FL1:179 pb	0,069	0,034
105	ISSR-FL1:276 pb	0,007	0,008	147	ISSR-FL1:145 pb	0,553	0,042
106	ISSR-FL1:269 pb	0,111	0,231	148	ISSR-FL1:137 pb	0,106	0,012
107	ISSR-FL1:254 pb	0,057	0,298	149	ISSR-FL1:127 pb	0,003	0,122
108	ISSR-FL1:236 pb	0,408	0,000	150	ISSR-FL2:801 pb	0,091	0,066
109	ISSR-FL1:227 pb	0,004	0,284	151	ISSR-FL2:618 pb	0,001	0,009
110	ISSR-FL1:208 pb	0,499	0,026	152	ISSR-FL2:524 pb	0,004	0,284
111	ISSR-FL1:198 pb	0,110	0,469	153	ISSR-FL2:413 pb	0,001	1,187
112	ISSR-FL1:179 pb	0,001	0,150	154	ISSR-FL2:390 pb	0,197	0,048
113	ISSR-FL1:179 pb	0,069	0,034	155	ISSR-FL2:388 pb	0,008	0,500
114	ISSR-FL1:145 pb	0,553	0,042	156	ISSR-FL2:372 pb	0,586	0,150
115	ISSR-FL1:137 pb	0,106	0,012	157	ISSR-FL2:353 pb	1,129	0,107
116	ISSR-FL1:127 pb	0,003	0,122	158	ISSR-FL2:322 pb	0,359	0,887
117	ISSR-FL1:1384 pb	0,499	0,026	159	ISSR-FL2:307 pb	0,008	0,500
118	ISSR-FL1:1024 pb	0,499	0,026	160	ISSR-FL2:286 pb	1,051	0,174
119	ISSR-FL1:875 pb	0,362	0,058	161	ISSR-FL2:259 pb	0,000	0,945
120	ISSR-FL1:792 pb	0,004	0,284	162	ISSR-FL2:234 pb	0,003	2,109
121	ISSR-FL1:792 pb	0,057	0,298	163	ISSR-FL2:214 pb	0,057	0,298
122	ISSR-FL1:709 pb	0,010	0,240	164	ISSR-FL2:198 pb	0,002	0,049
123	ISSR-FL1:640 pb	1,129	0,107	165	ISSR-FL2:186 pb	0,001	0,150
124	ISSR-FL1:640 pb	0,128	0,047	166	ISSR-FL2:167 pb	0,004	1,246
125	ISSR-FL1:603 pb	0,000	0,094	167	ISSR-FL2:153 pb	0,000	0,267
126	ISSR-FL1:600 pb	0,069	0,034	168	ISSR-FL3:658 pb	0,010	0,240

Annexe II.6 (suite) Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. luteus*

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
169	ISSR-FL3:490 pb	0,083	0,281	211	ISSR-FL4:194 pb	0,424	0,050
170	ISSR-FL3:398 pb	0,076	0,098	212	ISSR-FL4:183 pb	0,010	0,240
171	ISSR-FL3:362 pb	0,008	0,500	213	ISSR-FL4:166 pb	0,090	0,862
172	ISSR-FL3:340 pb	0,602	0,283	214	ISSR-FL4:153 pb	0,004	0,284
173	ISSR-FL3:308 pb	0,142	2,602	215	ISSR-FL4:153 pb	0,004	0,284
174	ISSR-FL3:286 pb	0,057	0,298	216	ISSR-FL4:137 pb	0,470	0,255
175	ISSR-FL3:282 pb	0,008	0,500	217	ISSR-FL5:1334 pb	0,057	0,298
176	ISSR-FL3:261 pb	0,010	0,240	218	ISSR-FL5:1178 pb	0,008	0,500
177	ISSR-FL3:244 pb	0,000	1,484	219	ISSR-FL5:987 pb	0,010	0,240
178	ISSR-FL3:225 pb	0,098	1,673	220	ISSR-FL5:907 pb	0,083	0,281
179	ISSR-FL3:203 pb	0,499	0,026	221	ISSR-FL5:885 pb	0,057	0,298
180	ISSR-FL3:192 pb	0,170	0,702	222	ISSR-FL5:716 pb	0,145	0,010
181	ISSR-FL3:179 pb	0,000	0,073	223	ISSR-FL5:668 pb	0,131	0,001
182	ISSR-FL3:179 pb	0,001	0,009	224	ISSR-FL5:533 pb	0,378	0,136
183	ISSR-FL3:166 pb	0,103	0,278	225	ISSR-FL5:511 pb	0,499	0,026
184	ISSR-FL3:150 pb	0,991	1,137	226	ISSR-FL5:492 pb	0,069	0,034
185	ISSR-FL4:1703 pb	0,008	0,500	227	ISSR-FL5:451 pb	0,057	0,298
186	ISSR-FL4:1236 pb	0,004	0,284	228	ISSR-FL5:427 pb	0,602	0,283
187	ISSR-FL4:1120 pb	1,601	0,020	229	ISSR-FL5:413 pb	0,109	0,000
188	ISSR-FL4:936 pb	0,057	0,298	230	ISSR-FL5:411 pb	0,083	0,281
189	ISSR-FL4:759 pb	0,000	0,267	231	ISSR-FL5:380 pb	0,086	0,191
190	ISSR-FL4:701 pb	0,814	0,027	232	ISSR-FL5:351 pb	0,000	0,267
191	ISSR-FL4:674 pb	0,124	0,044	233	ISSR-FL5:335 pb	1,129	0,107
192	ISSR-FL4:630 pb	0,176	0,002	234	ISSR-FL5:318 pb	1,134	0,140
193	ISSR-FL4:560 pb	0,004	0,284	235	ISSR-FL5:313 pb	0,432	0,053
194	ISSR-FL4:523 pb	0,000	0,267	236	ISSR-FL5:292 pb	0,014	0,001
195	ISSR-FL4:504 pb	0,197	0,048	237	ISSR-FL5:266 pb	0,461	0,002
196	ISSR-FL4:482 pb	0,363	0,023	238	ISSR-FL5:215 pb	0,553	0,042
197	ISSR-FL4:475 pb	0,010	0,240	239	ISSR-FL5:205 pb	0,499	0,026
198	ISSR-FL4:436 pb	0,106	0,012	240	ISSR-FL5:196 pb	0,091	0,066
199	ISSR-FL4:413 pb	0,881	0,000	241	ISSR-FL5:184 pb	0,957	0,004
200	ISSR-FL4:390 pb	0,091	0,066	242	ISSR-FL5:164 pb	0,553	0,042
201	ISSR-FL4:348 pb	0,001	1,187	243	ISSR-FL5:151 pb	0,010	0,240
202	ISSR-FL4:326 pb	0,010	0,240	244	ISSR-FL5:129 pb	0,001	0,009
203	ISSR-FL4:300 pb	0,347	0,001	245	ISSR-FL5:116 pb	0,001	0,150
204	ISSR-FL4:296 pb	0,076	0,098	246	ISSR-FL6:582 pb	0,000	0,267
205	ISSR-FL4:283 pb	0,001	0,009	247	ISSR-FL6:555 pb	0,004	0,284
206	ISSR-FL4:269 pb	0,002	0,018	248	ISSR-FL6:496 pb	0,100	0,126
207	ISSR-FL4:254 pb	0,475	0,081	249	ISSR-FL6:453 pb	0,541	0,239
208	ISSR-FL4:235 pb	0,006	0,006	250	ISSR-FL6:437 pb	0,331	0,106
209	ISSR-FL4:220 pb	0,316	0,039	251	ISSR-FL6:409 pb	0,000	0,003
210	ISSR-FL4:208 pb	0,086	0,191	252	ISSR-FL6:379 pb	0,499	0,026

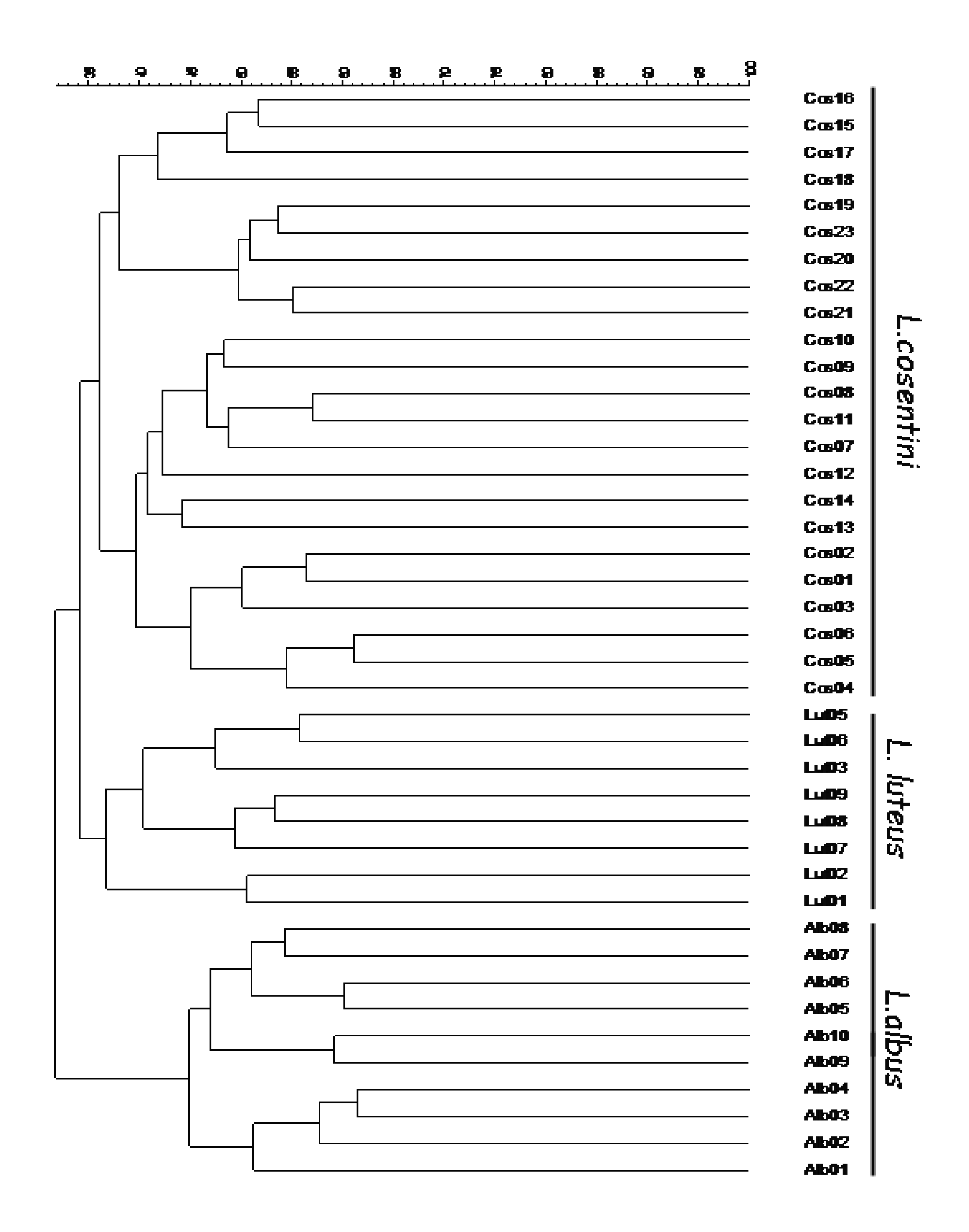
Annexe II.6 (suite) Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. luteus*

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
253	ISSR-FL6:358 pb	0,162	0,007	295	ISSR-FL8:369 pb	0,362	0,058
254	ISSR-FL6:339 pb	0,046	0,971	296	ISSR-FL8:323 pb	0,086	0,394
255	ISSR-FL6:304 pb	0,431	0,873	297	ISSR-FL8:297 pb	0,124	0,044
256	ISSR-FL6:265 pb	0,586	0,150	298	ISSR-FL8:281 pb	0,014	0,003
257	ISSR-FL6:264 pb	0,457	0,564	299	ISSR-FL8:256 pb	0,363	0,023
258	ISSR-FL6:197 pb	0,144	0,000	300	ISSR-FL8:232 pb	0,457	0,564
259	ISSR-FL6:182 pb	1,051	0,174	301	ISSR-FL8:209 pb	0,957	0,004
260	ISSR-FL6:109 pb	0,069	0,034	302	ISSR-FL8:187 pb	0,384	0,076
261	ISSR-FL6:107 pb	0,010	0,240	303	ISSR-FL8:173 pb	0,083	0,281
262	ISSR-FL7:638 pb	0,118	0,021	304	ISSR-FL8:163 pb	0,421	0,856
263	ISSR-FL7:535 pb	0,006	0,031	305	ISSR-FL8:151 pb	0,424	0,050
264	ISSR-FL7:454 pb	0,602	0,283	306	ISSR-FL8:151 pb	0,076	0,098
265	ISSR-FL7:419 pb	0,553	0,042	307	ISSR-FL8:134 pb	0,004	0,284
266	ISSR-FL7:383 pb	0,383	0,790	308	ISSR-FL9:1613 pb	0,008	0,500
267	ISSR-FL7:353 pb	0,005	0,553	309	ISSR-FL9:1449 pb	0,008	0,500
268	ISSR-FL7:340 pb	0,000	0,003	310	ISSR-FL9:1449 pb	0,057	0,298
269	ISSR-FL7:302 pb	0,176	0,002	311	ISSR-FL9:1355 pb	0,001	0,150
270	ISSR-FL7:302 pb	0,489	0,402	312	ISSR-FL9:919 pb	0,424	0,050
271	ISSR-FL7:277 pb	0,378	0,136	313	ISSR-FL9:778 pb	0,362	0,058
272	ISSR-FL7:234 pb	0,080	0,232	314	ISSR-FL9:639 pb	0,091	0,051
273	ISSR-FL7:219 pb	0,091	0,066	315	ISSR-FL9:551 pb	0,378	0,136
274	ISSR-FL7:219 pb	0,091	0,066	316	ISSR-FL9:523 pb	0,118	0,021
275	ISSR-FL7:204 pb	0,003	0,122	317	ISSR-FL9:497 pb	0,553	0,042
276	ISSR-FL7:188 pb	0,001	0,009	318	ISSR-FL9:479 pb	0,091	0,066
277	ISSR-FL7:173 pb	0,103	0,278	319	ISSR-FL9:458 pb	0,000	0,267
278	ISSR-FL7:146 pb	0,541	0,239	320	ISSR-FL9:437 pb	0,014	0,003
279	ISSR-FL7:127 pb	0,008	0,500	321	ISSR-FL9:422 pb	0,499	0,026
280	ISSR-FL7:127 pb	0,008	0,500	322	ISSR-FL9:405 pb	0,000	0,073
281	ISSR-FL7:117 pb	0,100	0,126	323	ISSR-FL9:362 pb	0,081	0,004
282	ISSR-FL7:108 pb	0,457	0,564	324	ISSR-FL9:337 pb	0,004	0,284
283	ISSR-FL8:1406 pb	0,008	0,500	325	ISSR-FL9:301 pb	0,009	0,042
284	ISSR-FL8:1021 pb	0,039	0,253	326	ISSR-FL9:286 pb	0,135	0,001
285	ISSR-FL8:787 pb	0,100	0,126	327	ISSR-FL9:259 pb	0,325	0,247
286	ISSR-FL8:679 pb	0,057	0,298	328	ISSR-FL9:234 pb	0,091	0,066
287	ISSR-FL8:635 pb	0,001	0,150	329	ISSR-FL9:207 pb	0,008	0,500
288	ISSR-FL8:576 pb	0,008	0,500	330	ISSR-FL9:176 pb	0,144	0,000
289	ISSR-FL8:549 pb	0,000	0,267	331	ISSR-FL9:165 pb	0,137	0,189
290	ISSR-FL8:496 pb	0,051	0,108	332	ISSR-FL9:143 pb	0,008	0,500
291	ISSR-FL8:466 pb	0,109	0,000	333	ISSR-FL9:126 pb	0,000	0,267
292	ISSR-FL8:438 pb	0,008	0,500	334	ISSR-FL10:1343 pb	0,499	0,026
293	ISSR-FL8:406 pb	0,076	0,098	335	ISSR-FL10:1112 pb	0,008	0,500
294	ISSR-FL8:406 pb	0,002	0,018	336	ISSR-FL10:882 pb	0,000	0,003

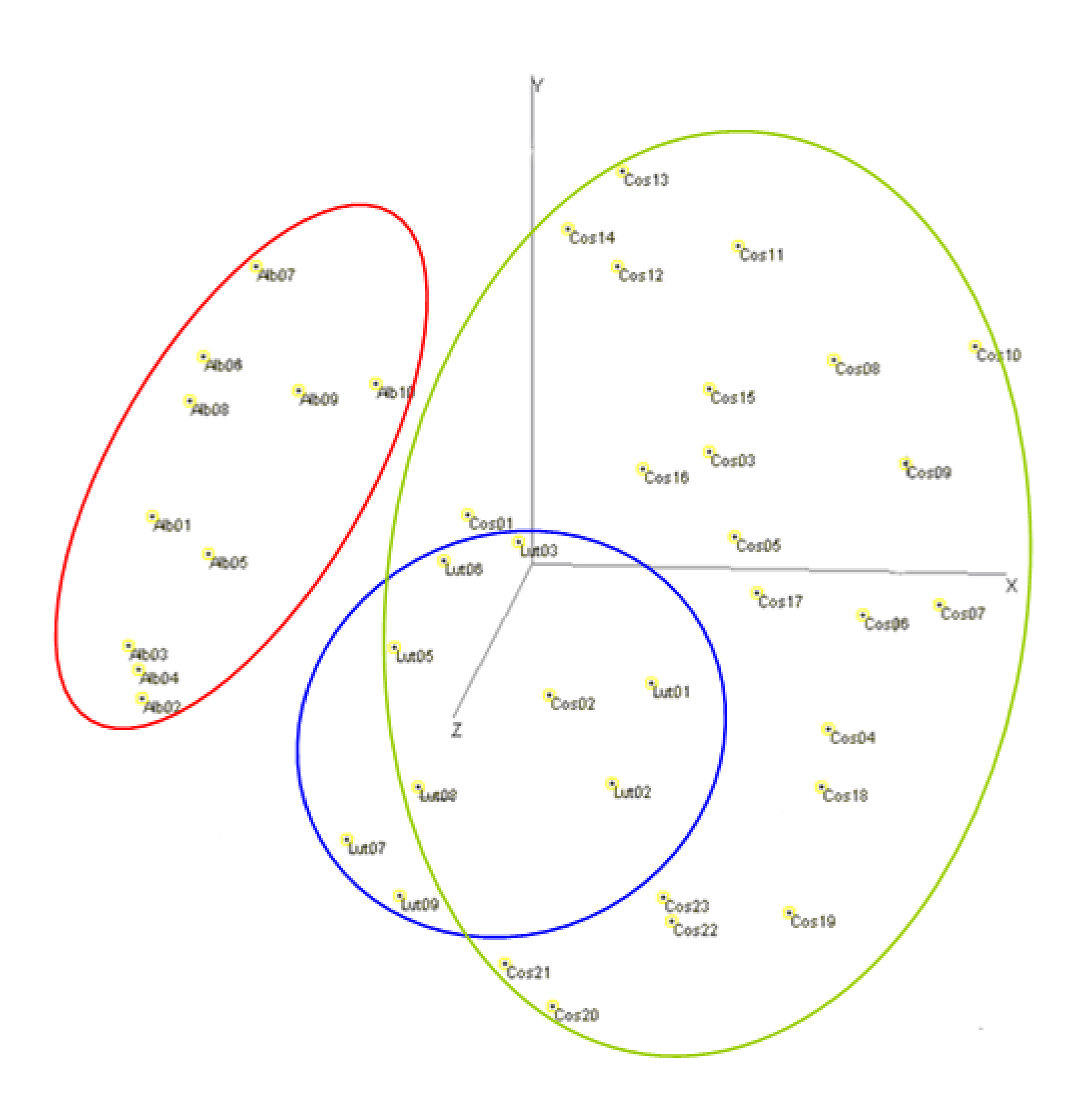
Annexe II.6 (suite) Contribution des marqueurs ISSR obtenus dans l`ACP réalisée dans l`analyse intra-spécifique de *L. luteus*

		Contributions des variables (%)				Contributions des variables (%)	
Code	**Marqueur**	**F1**	**F2**	**Code**	**Marqueur**	**F1**	**F2**
337	ISSR-FL10:747 pb	0,174	0,002	365	ISSR-FL11:573 pb	0,000	0,267
338	ISSR-FL10:687 pb	0,176	0,002	366	ISSR-FL11:549 pb	0,474	0,039
339	ISSR-FL10:639 pb	0,087	0,289	367	ISSR-FL11:517 pb	0,553	0,042
340	ISSR-FL10:547 pb	0,000	0,073	368	ISSR-FL11:486 pb	0,076	0,161
341	ISSR-FL10:543 pb	0,008	0,500	369	ISSR-FL11:459 pb	0,083	0,281
342	ISSR-FL10:488 pb	0,001	0,150	370	ISSR-FL11:439 pb	0,069	0,034
343	ISSR-FL10:367 pb	0,001	0,150	371	ISSR-FL11:436 pb	0,010	0,240
344	ISSR-FL10:351 pb	0,276	0,117	372	ISSR-FL11:420 pb	0,144	0,000
345	ISSR-FL10:334 pb	0,952	0,584	373	ISSR-FL11:384 pb	1,601	0,020
346	ISSR-FL10:319 pb	0,000	0,267	374	ISSR-FL11:366 pb	0,432	0,053
347	ISSR-FL10:296 pb	0,008	0,500	375	ISSR-FL11:361 pb	0,553	0,042
348	ISSR-FL10:249 pb	0,083	0,281	376	ISSR-FL11:337 pb	0,004	0,426
349	ISSR-FL10:240 pb	0,091	0,066	377	ISSR-FL11:323 pb	0,073	0,261
350	ISSR-FL10:223 pb	0,001	0,150	378	ISSR-FL11:295 pb	0,408	0,000
351	ISSR-FL10:195 pb	0,111	0,231	365	ISSR-FL11:281 pb	0,001	0,009
352	ISSR-FL10:182 pb	0,000	0,267	366	ISSR-FL11:265 pb	0,408	0,000
353	ISSR-FL10:155 pb	0,378	0,136	367	ISSR-FL11:250 pb	0,001	0,009
354	ISSR-FL10:125 pb	0,553	0,042	368	ISSR-FL11:234 pb	0,541	0,239
355	ISSR-FL10:105 pb	0,001	0,150	369	ISSR-FL11:231 pb	0,005	0,002
356	ISSR-FL11:987 pb	0,004	0,284	370	ISSR-FL11:212 pb	0,059	0,206
357	ISSR-FL11:869 pb	0,008	0,500	371	ISSR-FL11:202 pb	0,090	2,023
358	ISSR-FL11:839 pb	0,014	0,003	372	ISSR-FL11:182 pb	0,088	0,027
359	ISSR-FL11:760 pb	0,008	0,500	373	ISSR-FL11:170 pb	0,000	0,550
360	ISSR-FL11:728 pb	0,069	0,034	374	ISSR-FL11:158 pb	0,130	0,234
361	ISSR-FL11:694 pb	0,008	0,500	375	ISSR-FL11:145 pb	0,375	0,009
362	ISSR-FL11:647 pb	0,001	0,150	376	ISSR-FL11:138 pb	0,952	0,584
363	ISSR-FL11:624 pb	0,109	0,154	377	ISSR-FL11:122 pb	0,553	0,042
364	ISSR-FL11:595 pb	0,076	0,161				

Annexe II.7. Classification hiérarchique des populations de lupin utilisées à la base des marqueurs ISSR.



Annexe II.8. Représentation tridimensionnelle ou multi dimensional scaling des populations du genre *Lupinus* en utilisant les marqueurs ISSR.



Annexe III.1. Extraction de l'ARN chez le lupin blanc (Maxi préparation)

- Broyer 2g de tissus dans de l'azote liquide
- Au broyat ajouter 9 ml de tampon d'extraction (Acétate de Na 0.2 M, EDTA 10 mM), 1 ml de 10 % de SDS et 10 ml de phénol. Homogénéiser le mélange pendant 5-10 minutes
- Ajouter 10 ml de Chloroforme/ alcool isoamylic à l'homogénat et mélanger pendant 5-10 minutes
- Centrifuger pendant 10 min à 10000g
- Au surnageant récupéré ajouter 5 ml de phénol, 5 ml de chloroforme / alcool isoamylic (24/1) et mélanger pendant 5-10 min
- Centrifuger pendant 10 min à 10000g
- Au surnageant récupéré ajouter 10 ml de chloroforme/ alcool isoamylic et mélanger pendant 5-10 min
- Centrifuger pendant 10 min à 10000g
- Au surnageant récupéré ajouter le 1/3 du volume de LiCl 8 M
- Mélanger et incuber à + 4°C toute une nuit
- Centrifuger pendant 30 min à 8000g
- Laver le culot récupéré avec 3 ml of LiCl 2 M ensuite 2 fois avec de 70 % l'éthanol froid
- Sécher le culot sous vide
- Suspender les ARN dans de l'eau DEPEC
- Conserver les ARN à - 70°C
- Les ARN sont traités à la DNAase avant de les utiliser dans les PCR quantitatives.

La quantité des ARN est calculée suite au dosage par spectrophotomètre à 260 et 280 nm.

La qualité des ARN est évaluée sur un gel d'agarose- formamide dénaturant.

Annexe III.2. Expression des facteurs de transcriptions en réponse au différents stress analysés.

Gènes	Feuilles			Racines Normales			Racines proteoïdes		
	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P
888_F	1,384	0,151	0,346	0,062	0,180	0,163	0,810	0,658	2,508
E732	1,418	0,086	0,081	0,595	0,172	0,010	0,691	0,835	1,502
405_F	1,104	0,077	0,120	0,845	0,232	0,573	0,975	0,809	1,834
YPR_011_E05 _036.ab1	1,495	0,141	0,386	0,114	0,150	0,197	0,586	1,622	2,059
YPR_013_E04 _023.ab1	1,416	0,106	0,376	0,094	0,126	0,154	0,450	1,856	1,547
YPR_001_G03 _020.ab1	1,387	0,071	0,376	0,106	0,089	0,187	0,607	1,475	1,590
YPR_001_G11 _084	1,576	0,136	0,243	0,123	0,120	0,197	0,267	1,377	2,699
818_F	1,463	0,123	0,353	0,083	0,152	0,233	0,294	1,476	1,405
1402_F	1,809	0,174	0,116	0,303	0,112	0,416	0,644	0,588	1,314
739_F	1,170	0,141	0,259	0,097	0,247	0,132	0,488	0,244	1,729
YPR_013_H02 _016.ab1	1,447	0,144	0,399	0,141	0,225	0,244	0,487	1,043	3,138
YPR_013_E07 _051.ab1	1,485	0,108	0,395	0,066	0,146	0,137	0,488	1,132	1,399
YPR_006_A05 _034.ab1	1,447	0,094	0,389	0,111	0,132	0,097	0,583	1,329	1,218
E080_F	1,386	0,126	0,374	0,111	0,141	0,176	0,464	2,401	4,724
E647_F	1.445	0,128	0,433	0,127	0,145	0,118	0,123	1,027	2,324
53_F	1,254	0,146	0,353	0,084	0,220	0,173	0,394	0,484	1,795
YPR_005_E05 _036.ab1	1,381	0,150	0,383	0,107	0,158	0,205	0,129	1,368	3,353
YPR_001_B03 _025.ab1	1,479	0,114	0,371	0,137	0,152	0,224	0,341	1,082	1,029
YPR_008_A04 _022.ab1	1.410	0,135	0,338	0,147	0,199	0,272	0,182	0,517	2,308
889_F	1.438	0,139	0,344	0,104	0,186	0,258	0,567	0,707	2,908
138_F	1,295	0,199	0,287	0,210	0,093	0,155	1,006	0,839	1,025
86_F	1,256	0,140	0,349	0,100	0,195	0,146	0,376	0,601	1,603
YPR_009_H08 _064.ab1	1,405	0,144	0,404	0,132	0,167	0,235	0,460	1,343	1,597
YPR_008_E12 _088.ab1	1,438	0,096	0,293	0,121	0,168	0,187	0,370	1,484	0,731
YPR_010_A05 _034.ab1	1,436	0,107	0,049	0,146	0,170	0,298	0,130	0,758	1,729
783_F	1,419	0,140	0,398	0,134	0,179	0,236	0,439	0,624	2,329
545_F	1,467	0,076	0,341	0,030	0,120	0,269	0,323	0,883	1,502
88_F	1,294	0,135	0,292	0,078	0,201	0,236	0,472	0,672	1,708
YPR_002_H07 _060ab1	1,412	0,150	0,366	0,135	0,162	0,228	0,353	1,204	2,492
YPR_009_E11 _083.ab1	1,451	0,078	0,382	0,090	0,119	0,300	0,311	1,315	0,691
YPR_009_C01 _002.ab1	1,386	0,093	0,376	0,121	0,139	0,286	0,111	1,335	3,001
880_F	1,401	0,125	0,388	0,099	0,151	0,205	0,110	3,400	1,229
1325_F	1,364	0,090	0,336	0,051	0,096	0,113	0,229	0,812	0,816
E137	1,490	0,141	0,425	0,133	0,148	0,223	0,316	1,350	1,552
YPR_009_D11 _090.ab1	1,407	0,147	0,367	0,117	0,152	0,202	0,046	1,292	1,929
YPR_006_D12 _095.ab	1,457	0,079	0,389	0,081	0,092	0,219	0,259	1,248	1,167
YPR_008_C12 _087.ab1	1,437	0,139	0,377	0,123	0,164	0,231	0,782	0,930	2,275
619_F	1,326	0,136	0,290	0,057	0,166	0,133	0,079	1,427	1,569
411_F	1,475	0,070	0,384	0,047	0,089	0,110	0,072	1,247	1,293

Le sur lignage indique les gènes qui sont sur-exprimés ( ) ou sous exprimés ( ).

Annexe III.2 (suite). Expression des facteurs de transcription en réponse au différents stress

Génes	Feuilles			Racines Normales			Racines proteoïdes		
	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P
YPR_005_F11 _092.ab1	1,552	0,149	0,392	0,136	0,156	0,225	1.262	2,301	2,357
YPR_008_A08 _054.ab1	1,436	0,153	0,391	0,130	0,163	0,216	3,107	2,786	4,033
YPR_002_C05 _034.ab1	1,443	0,107	0,398	0,097	0,118	0,178	0,233	1,291	0,957
YPR_009_G07 _052.ab1	1,366	0,129	0,375	0,093	0,155	0,193	0,290	0,974	2,235
37_F	1,286	0,087	0,362	0,033	0,167	0,364	0,082	0,443	0,882
625_F	1,294	0,141	0,366	0,072	0,160	0,226	0,001	1,043	2,197
E560	1,450	0,138	0,401	0,099	0,152	0,223	0,150	1,512	1,552
YPR_008_A07 _050ab1	1,465	0,140	0,380	0,132	0,151	0,208	0,064	1,962	1,722
YPR_007_F07 _059.ab1	1,468	0,111	0,404	0,127	0,131	0,173	0,001	0,812	0,555
YPR_010_H08 _073.ab1	1,433	0,127	0,365	0,099	0,154	0,176	0,013	1,022	2,033
285_F	1,060	0,106	0,343	0,116	0,328	0,393	0,575	0,800	0,771
637_F	1,067	0,009	0,184	0,722	0,073	0,166	0,988	1,909	0,821
YPR_005_B06 _046.ab1	1,451	0,141	0,412	0,146	0,172	0,231	0,008	1,655	1,943
YPR_003_A05 _033ab1	1,431	0,146	0,387	0,129	0,150	0,217	3,151	2,100	2,719
YPR_010_B03 _026.ab1	1,477	0,116	0,401	0,124	0,134	0,228	0,078	0,794	0,440
YPR_002_D11 _090.ab1	1,439	0,146	0,415	0,132	0,161	0,245	1,866	6,856	5,801
1021_F	1,279	0,132	0,426	0,017	0,139	0,229	0,633	0,906	0,772
365_F	1,369	0,136	0,401	0,102	0,165	0,258	0,176	1,203	3,218
90_F	2,116	0,532	2,322	0,448	0,006	0,220	0,748	0,786	1,077
931_F	1,433	0,149	0,350	0,127	0,170	0,189	0,277	1,617	7,303
93_F	1,466	0,139	0,277	0,114	0,165	0,195	0,626	0,805	3,240
942_F	1,438	0,154	0,383	0,128	0,160	0,216	0,241	0,112	0,560
993_F	1,398	0,146	0,332	0,133	0,167	0,221	0,206	0,425	1,193
E063_F	1,451	0,138	0,326	0,115	0,157	0,199	0,231	0,613	1,915
E087_F	1,465	0,120	0,204	0,095	0,188	0,249	0,175	0,261	1,253
E092_F	1,478	0,092	0,148	0,176	0,267	0,310	0,259	0,897	1,969
E135_F	1,983	0,248	0,545	0,245	0,143	0,136	1,371	0,643	0,886
E272_F	1,449	0,137	0,371	0,120	0,172	0,247	0,057	0,373	0,441
E333_F	1,437	0,132	0,349	0,127	0,153	0,236	1,083	0,453	1,009
E368_F	1,336	0,119	0,319	0,075	0,160	0,205	0,914	0,236	1,660
E385_F	1,347	0,140	0,345	0,148	0,176	0,202	0,967	4,216	12,576
E392_F	1,402	0,152	0,215	0,114	0,203	0,201	0,091	0,804	2,660
E397_F	1,441	0,123	0,204	0,136	0,258	0,261	0,123	0,149	1,343
E399_F	1,398	0,085	0,187	0,138	0,213	0,340	0,464	0,003	1,859
E463_F	1,424	0,105	0,263	0,138	0,181	0,259	0,100	0,662	1,612
E473_F	1,393	0,007	0,046	0,496	0,304	0,105	0,355	0,345	1,271
E478_F	1,412	0,143	0,304	0,124	0,155	0,235	1,298	0,395	1,769
E485_F	1,462	0,044	0,029	0,109	0,267	0,313	0,170	0,407	1,014
E491_F	2,222	0,716	1,660	0,213	0,051	0,071	0,338	0,070	0,844

Le sur lignage indique les gènes qui sont sur-exprimés ( ) ou sous exprimés ( ).

Annexe III.2 (suite). Expression des facteurs de transcription en réponse au différents stress

Génes	Feuilles			Racines Normales			Racines proteoïdes		
	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P	-P/+P	-N/+P	-Fe/+P
E501_F	1,438	0,147	0,361	0,113	0,180	0,252	1,046	0,414	0,738
E502_F	1,443	0,124	0,234	0,105	0,170	0,259	0,228	1,029	0,163
YPR_002_F03 _027.ab1	1,488	0,139	0,391	0,118	0,146	0,220	0,082	1,202	1,461
YPR_010_E03 _020.ab1	1,429	0,103	0,407	0,100	0,124	0,236	0,354	1,056	0,428
YPR_002_F06 _047.ab1	1,445	0,113	0,400	0,100	0,129	0,213	0,337	0,806	0,375
YPR_003_E10 _071.ab1	1,431	0,146	0,401	0,141	0,157	0,225	4,538	3,289	3,229
735_F	1,380	0,134	0,390	0,112	0,144	0,218	0,805	1,867	2,783
37_F	1,374	0,123	0,374	0,122	0,160	0,271	0,060	0,528	1,160
YPR_008_B06 _046.ab1	1,466	0,146	0,425	0,122	0,153	0,210	0,782	1,642	1,404
YPR_008_D10 _079.ab1	1,430	0,105	0,415	0,090	0,110	0,145	0,448	1,435	0,194
YPR_009_G08 _056.ab1	1,427	0,108	0,390	0,100	0,133	0,175	0,007	0,801	0,096
YPR_006_G10 _081	1,455	0,144	0,348	0,125	0,151	0,210	0,747	1,084	0,787
E702_F	1,329	0,163	0,564	0,537	0,381	0,398	0,346	0,999	1,437
285_F	6,487	1,063	2,511	0,445	0,152	0,155	1,239	0,770	1,012
YPR_002_E12 _087.ab1 _087.ab1	1,515	0,105	0,460	0,090	0,133	0,173	0,202	1,568	1,375
YPR_013 _F04_031.ab1	1,473	0,055	0,351	0,061	0,062	0,136	0,278	1,522	0,339
YPR_007_H10 _080.ab1	1,464	0,042	0,397	0,076	0,036	0,140	0,360	1,353	0,413
YPR_010_F10 _080	1,548	0,115	0,415	0,100	0,120	0,188	0,127	1,011	0,598
E749_F	1,506	0,038	0,086	0,200	0,836	0,516	0,693	0,125	1,760
1028_F	1,510	0,148	0,329	0,129	0,179	0,179	5,733	6,275	33,118
1053_F	1,432	0,148	0,372	0,129	0,164	0,239	0,017	0,520	0,952
1182_F	1,428	0,143	0,351	0,119	0,159	0,207	1,194	0,155	2,572
1206_F	1,351	0,143	0,239	0,095	0,134	0,181	0,483	0,135	1,480
122_F	1,544	0,085	1,179	0,265	0,088	0,167	0,691	0,700	1,009
1280_F	1,393	0,149	0,296	0,126	0,164	0,223	0,124	0,531	1,372
1355_F	1,398	0,084	0,122	0,032	0,022	0,138	0,267	0,070	0,099
1358_F	1,433	0,148	0,384	0,135	0,156	0,218	3,405	1,051	10,662
137_F	1,390	0,114	0,242	0,119	0,113	0,202	0,456	0,480	32,131
1412_F	1,700	0,267	0,468	0,414	0,150	0,225	1,536	0,538	0,886
1425_F	1,400	0,116	0,297	0,083	0,136	0,120	0,109	0,087	3,647
E520_F	1,466	0,067	0,204	0,076	0,132	0,215	0,081	0,122	0,978
E529_F	1,417	0,116	0,259	0,158	0,209	0,195	0,080	0,704	3,901
E541_F	1,452	0,127	0,204	0,131	0,226	0,198	0,751	0,915	5,187
E545_F	1,373	0,148	0,358	0,133	0,159	0,210	0,975	0,962	2,562
E585_F	1,655	0,115	0,020	0,424	0,042	0,132	0,741	0,089	1,595
E598_F	1,527	0,116	0,329	0,130	0,171	0,197	0,680	2,169	3,598
E627_F	1,416	0,151	0,292	0,122	0,182	0,228	0,355	0,668	1,998

Le sur lignage indique les gènes qui sont sur-exprimés ( ) ou sous exprimés ( ).

Annexe III.2 (suite). Expression des facteurs de transcription en réponse au différents stress

Code EST	Feuilles			Racines Normales			Racines proteoïdes		
	-P/+P	**-N/+P**	**-Fe/+P**	**-P/+P**	**-N/+P**	**-Fe/+P**	**-P/+P**	**-N/+P**	**-Fe/+P**
E627_F	1,416	0,151	0,292	0,122	0,182	0,228	0,355	0,668	1,998
E630_F	1,398	0,157	1,534	0,392	0,039	0,026	0,457	0,048	0,545
E659_F	1,443	0,034	0,256	0,847	1,146	1,249	0,368	0,473	0,736
E692_F	0,891	0,013	0,077	1,278	1,164	1,578	0,471	0,189	0,401
E706_F	1,430	0,131	0,280	0,122	0,177	0,249	0,130	0,318	0,631
E730_F	1,482	0,113	0,254	0,111	0,165	0,224	0,272	0,262	1,230
E742_F	1,518	0,107	0,255	0,126	0,152	0,232	0,214	0,254	2,270
E745_F	1,465	0,147	0,361	0,138	0,169	0,207	2,510	1,163	3,876
E755_F	1,461	0,149	0,381	0,135	0,159	0,220	5,209	4,249	1,805
E758_F	1,419	0,115	0,292	0,126	0,180	0,212	0,599	0,279	2,800
E761_F	1,394	0,135	0,174	0,124	0,199	0,170	0,093	1,208	3,258
E771_F	1,439	0,157	0,277	0,068	0,114	0,153	7,215	3,696	20,200
E775_F	1,444	0,154	0,350	0,119	0,175	0,228	1,025	1,083	1,825
E785_F	1,379	0,123	0,299	0,098	0,197	0,260	0,072	1,479	1,089
E794_F	1,161	0,117	0,268	0,033	0,282	0,308	0,392	0,689	1,206
E817_F	1,465	0,140	0,255	0,113	0,202	0,208	0,131	0,981	2,531
E844_F	1,780	0,058	0,024	0,318	0,629	0,219	0,283	0,397	1,390
E848_F	1,527	0,129	0,285	0,113	0,183	0,231	0,850	0,867	3,923
E849_F	1,127	0,117	0,084	0,141	0,111	0,181	0,209	0,374	0,389
YPR_011_A07_ 050.ab1_5_ORF1	1,440	0,131	0,335	0,150	0,190	0,250	0,304	0,328	0,968
YPR_012_H04_ 032.ab1_1_ORF2	1,445	0,145	0,339	0,125	0,154	0,222	1,855	0,729	1,284

Le sur lignage indique les gènes qui sont sur-exprimés (   ) ou sous exprimés (   ).

Annexe III.3. Marquage radioactif de l'ADN

La préparation de sondes radioactives consiste en le marquage de fragments d'ADN spécifique en utilisant le Kit de marquage High prime labelling kit (Roche Applied Science, USA). Les fragments d'ADN insérés dans des plasmides sont isolés par amplification ou par digestion.

1- Dénaturation des ADN:

10 ng d'ADN dans un volume final de 12µl sont dénaturés à 90°C pendant 10min. Les ADN dénaturés sont remis dans la glace rapidement.

2- Marquage des ADN:

Les ADN dénaturés sont marqués dans:

- 4µl du mélange réactionnel High prime
- 4µl de dNTP (dGTP, dCTP et dTTP)
- 5µl d'isotope ^{32}P dATP

Ce mélange est incubé à 37°C pendant 30min. La réaction est ensuite arrêtée par ajout de 2µl d'EDTA (0,2M) (PH 8.0). Le mélange est centrifugé dans une colonne de sephadex pour purifier et éliminer les nucléotides et l'isotope non incorporés. La réussite du marquage est vérifiée par quantification de la radioactivité incorporée.

Les sondes préparées doivent être dénaturées avant toute utilisation.

Annexe III.4. Préparation du Southern blot et conditions d'hybridation

10 µg d'ADN génomique totale du lupin est digéré par EcoRI et HindIII pendant toute une nuit à 37°C. Les ADN digérés sont soumis à une éléctrophorèse sur gel d'agarose de 0,8%. Le gel est ensuite traité pour dénaturer les ADN. En premier le gel est traité 10 à 15 min dans une solution de HCL 0,25M. Ensuite les ADN sont traités en placant le gel pendant 30min dans un bain de NaOH 0.5 N et de NaCl 1M. Le gel est ensuite neutralisé pendant 30 min dans du Tris-HCl 1.5M (PH 7.4) et NaCl 3M. Les ADN sont ensuite transférés sur une membrane Immobilon NY+ (Millipore, Bedford MA, USA). Le transfert est assuré pendant toute une nuit dans le tampon SSC10X. La membrane est ensuite séchée et fixée par rayons ultra violets UV.

Hybridation :

Les membranes du southern blot sont pré hybridées dans le tampon d'hybridation pendant 1 heure à 42C.

L'hybridation se fait dans le tampon d'hybridation additionné de sonde radioactive à raison de 1 million cpm par ml de tampon. Cette étape est réalisée pendant toute une nuit à 42°C.

Rinçage :

Les membranes sont soumises à trois lavages successifs de 20 min chaque et à 42°C:

- Lavage 1: SSC 2X, SDS 0.1 %
- Lavage 2: SSC 0.5X, SDS 0.1 %
- Lavage 3: SSC 0.1X, SDS 0.1 %

- Les membranes sont ensuite bien couvertes dans du plastique et exposées à un film radioactif pendant un minimum de 24h.

Tampon d'hybridation:

- Formamide
- Na_2HPO_4 1M (PH 7.2)
- NaCl (4M)
- EDTA (0.5 M)
- SDS (20%)

Ce tampon doit être chauffé à 42°C avant utilisation.

Annexe III.5. Milieu Fahraeus modifié

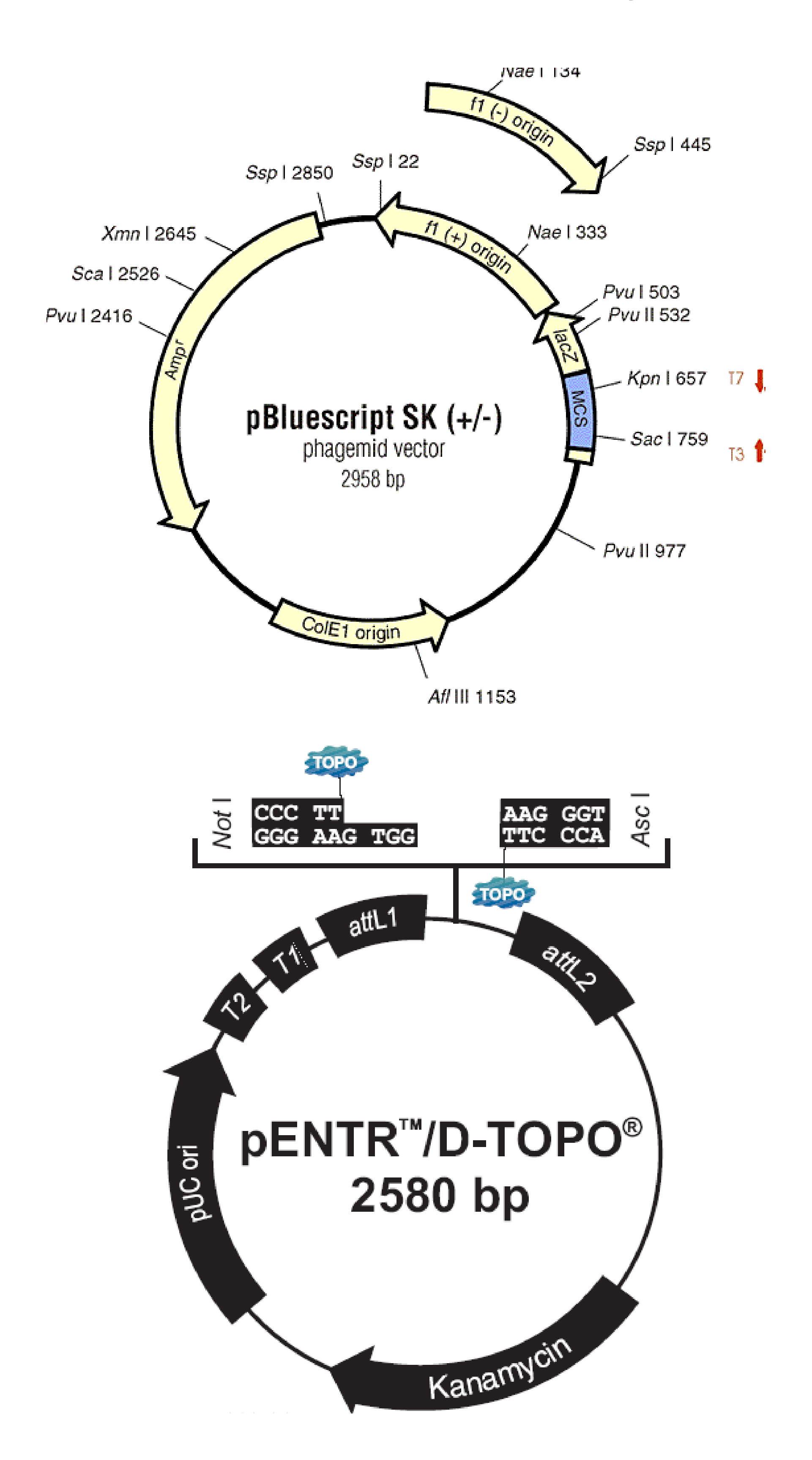
La solution nutritive est préparée avec les éléments suivants:

Solution nutritive sans azote

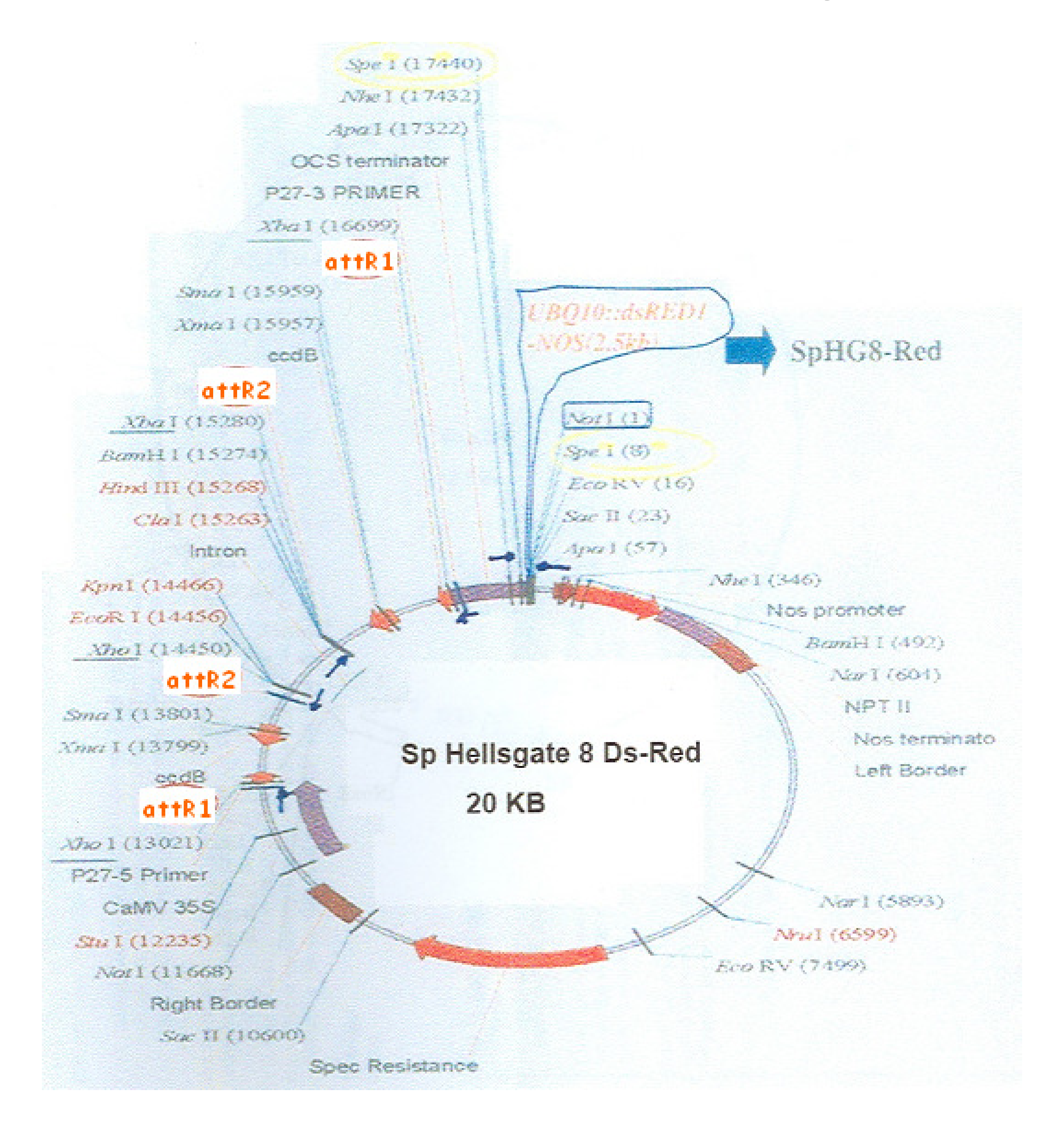
	Concentration finale
Macro éléments	
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 mM
$CaCl_2$	0.9 mM
$KH_2PO_4.3H_2O$	0.7 mM
Na_2HPO_4	0.8 mM
Citrate de fer	20 µM
NH_4NO_3	
Micro éléments	
$MnCl_2$	100 µg/ml
$CuSO_4$	100 µg/ml
$ZnCl_2$	100 µg/ml
H_3BO_4	100 µg/ml
$NaMoO_4$	100 µg/ml
Agar	100 µg/ml

- Ajuster le pH de la solution à 7.5
- Autoclaver la solution
- Laisser refroidir jusqu'à une température de 55-60°C
- Ajouter la kanamycine à raison de 27,5 µg/l
- Couler le milieu dans des boites stériles
- Les boites peuvent être conservées à +4°C pendant une durée maximale de 3 jours.

Annexe III.6. Cartes des vecteurs de clonage utilisés



Annexe III.6 (suite). Cartes des vecteurs de clonage utilisés



Annexe III.7. Test histochimique de l'activité ß-glucuronidase (GUS)

Le matériel à analyser est incubé dans un tampon phosphate constitué de:

- ***1 ml de Na_2PO_4 0,1 M (pH 7,0)***
- ***1 ml de K3 [Fe(CN)6] 0,1 M***
- ***2 gouttes K4 [Fe(CN)6] 0,1 M***
- ***Triton X- 100***
- ***4 ml d` EDTA 0,5 M (PH 8,0)***
- ***q.s.p 200 ml avec $NaPO_4$ (pH 7,0)***

A ce mélange on ajoute 200 mg du substrat, l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronique (X-Gluc) et on laisse homogénéiser pendant 30 min.

Le matériel incubé dans la solution X-Gluc est placé dans une cloche et infiltré sous vide pendant 10 min.

La suite de la réaction, qui produit de l'acide glucuronique s'effectue à 37°C. La coloration des échantillons est vérifiée chaque 20-30min.

Pour arrêter la coloration, les échantillons sont transférés dans une solution d'eau.
Pour une meilleure vision sous microscope les échantillons sont décolorés dans des bains successifs d'éthanol.

Annexe III.8. Liste des amorces utilisées

Amorce	Séquence 5' – 3'
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	CATTATGCTGAGTGATATCCCG
SCRF	CAATGTGCTGAAGCAGTTTCAGC
SCRFF	GTAATGCTGCCACTCAAGCCAGC
SCRF1	GTGCTAATGTTGAGGTGGCTG
SCRF2	GCACACTCACAGTCAGAAGC
SCRF5	GGAGGAGAGGTGAATTTATTAG
SCRF6	CTCACTCACCTTGGCTTCTCT
SCRF7	GATCTCCCATATCACCCACCGTG
SCRF8	GATATGTCTATGAGTGTATGG
SCRR1	CCACCATCAGGAAACTGATCAC
SCRR2	GGAATGTTGTAACCAACCAATGGAC
SCRR4	GCTCATGTCCTGCTCTACCACCG
SCRR5	GAGGCACTAGCTACTAGCTAC
LS01	CACCAAGCTGTTGCTGTCCATTGG
HG1236	TTCGCAACACCCTTCCTCTA
HG1237	TTCGTCTTACACATCACTTGTCA

-